

Joana Isabel da Silva Rodrigues

**Recuperação de metais de águas contaminadas por processos
baseados na utilização de extratos das plantas *Cistus ladanifer*
e *Erica andevalensis***



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2019

Joana Isabel da Silva Rodrigues

Recuperação de metais de águas contaminadas por processos baseados na utilização de extratos das plantas *Cistus ladanifer* e *Erica andevalensis*

Mestrado em Biotecnologia

Trabalho realizado sob a orientação de:

Prof. Dr^a Maria Clara Costa

Dr. Jorge Daniel Dias Carlier



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2019

Recuperação de metais de águas contaminadas por processos baseados na utilização de extratos das plantas *Cistus ladanifer* e *Erica andevalensis*

Declaração de autoria do trabalho:

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Joana Rodrigues)

© A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Quero deixar aqui os meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização desta tese.

Em primeiro lugar à Professora Clara Costa por me ter dado a oportunidade de trabalhar neste projeto e por toda ajuda no desenvolvimento do mesmo e ao Jorge Carlier pela sua orientação, apoio e disponibilidade ao longo deste último ano.

A todos os meus amigos em especial à Tatiana, Maria e João que apesar da distância estiveram sempre presentes quando foi preciso, e à Jéssica, Rayane e João com quem passei os melhores momentos nestes anos de mestrado.

Ao meu namorado pelo incentivo, companheirismo e paciência e principalmente por me ajudar a ultrapassar as fases mais difíceis e fazer-me sempre ver o lado positivo.

Por último, mas não menos importante quero deixar um agradecimento especial a toda a minha família por todo o apoio em especial aos meus pais e à minha irmã, aos quais dedico este trabalho.

Financiamento

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia - no âmbito do projeto Metalchembio (no. 29251) e do projeto UID / Multi / 04326/2019 e co-financiado pelo Programa Operacional Regional do Algarve (CRESC Algarve 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Resumo

Atualmente, devido à maior preocupação com os problemas ambientais que conseqüentemente levam a restrições à descarga de efluentes contaminados com metais, tornou-se essencial o desenvolvimento de processos sustentáveis e eficazes, visando a recuperação dos metais das águas residuais. Simultaneamente, inúmeras espécies vegetais foram descritas como tolerantes e acumuladores de metais, como é o caso de *Erica andevalensis* e *Cistus ladanifer*, ambas encontradas em Portugal na mina de São Domingos. Essa capacidade dessas plantas foi explorada no presente trabalho, visando a recuperação de metais de interesse a partir de soluções aquosas. Para essa finalidade, os principais objetivos desta pesquisa foram:

(1) obter extratos das plantas para serem utilizados em efluentes contaminados com metais, para remoção/recuperação dos metais de interesse e

(2) utilizar os compostos destas plantas em solventes orgânicos de forma a testar a sua eficácia para remoção/recuperação de metais pela técnica de extração por solvente (extração líquido-líquido).

Os testes com extratos hidroalcoólicos da planta *E. andevalensis* e *C. ladanifer* adicionados a soluções unimetalicas preparadas com HCl e H₂SO₄, mostraram que os metais do grupo platina (Pt e Pd) e ouro foram removidos (20 a 100%) em ambas as matrizes, bem como prata (90 a 100%) em H₂SO₄. O mesmo aconteceu com o ferro, mas em menor intervalo de remoção (15 a 25%). Por outro lado, a adição desses extratos a um efluente da eletrozincagem moderadamente contaminado com Zn e Fe resultou apenas em baixa remoção de Fe ($\leq 21\%$). Já na AMD com o extrato de *C. ladanifer* houve remoção de todos os metais (Al: ~63%, Zn: ~51%, Fe: ~52%, Cu: ~43% e Mn: ~36%); assim como com o extrato de *E. andevalensis*, apesar de em percentagens mais baixas (Al: ~10%, Zn: ~16%, Fe: ~21%, Cu: ~6% e Mn: ~1%).

Nos testes de recuperação de metais por extração por solventes mostrou que nos extratos de folhas de *C. ladanifer* preparados com Shell GTL e Octanol ou apenas Shell GTL, houve baixa extração de ferro (<10%) e não houve extração de zinco do efluente da zincagem. Quando se utilizou acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos de *C. ladanifer* o melhor rendimento em compostos fenólicos foi obtido quando se usou 80%

(v/v) de acetona em água acidificada (1,2 M HCl). Verificou-se também uma relação direta entre a concentração de fenóis no acetato de etilo e a eficiência das extrações de ferro e zinco (~34% e ~56%, respectivamente). Nos testes com os compostos fenólicos transferidos para outros solventes orgânicos (butirato de etilo, acetato de butilo, decanol e octanol) as eficiências das extrações de ferro e zinco foram relativamente baixas (<25%) para ambas as plantas.

Palavras-chave:

Extratos de plantas; Recuperação de Metais; água ácida de mina; Efluente da zincagem; Extração por solvente

Abstract

Nowadays, due to the greater concern about environmental problems and considering the restrictions on the discharge of effluents contaminated with metals, it is essential to develop sustainable and effective processes aiming the recovery of metals from waste streams. At the same time numerous plant species have been described as metal tolerant and accumulators, as is the case of *Erica andevalensis* and *Cistus ladanifer*, both found in Portugal in the São Domingos mining area. That capacity of those plants has been explored in the present work aiming the recovery of strategic metals from aqueous solutions. To achieve that purpose the main objectives of this research included:

- (1) to assess the use of hydroalcoholic plant extracts directly in metal contaminated effluents and artificial solutions for the removal / recovery of the metals of interest and
- (2) to assess the use of phenolic compounds extracted from those plants diluted in organic solvents for the removal / recovery of metals by solvent (also known as liquid-liquid) extraction technique.

The tests in which hydroalcoholic extracts of *E. andevalensis* and *C. ladanifer* were added to unimetallic solutions prepared with HCl and H₂SO₄, showed that the platinum group metals (Pt and Pd) and gold were removed (20 to 100%) from both matrices, as well as silver (90 to 100%) in H₂SO₄. The same happened with iron(III) but in a lower range of removal (15 to 25%). On the other hand, the addition of these extracts to a zinc plating effluent moderately contaminated with Zn and Fe resulted in no removal of Zn and low removal of Fe ($\leq 21\%$). On the contrary, when the hydroalcoholic extract of *C. ladanifer* was added to an extremely concentrated acid mine drainage (AMD) collected in the São Domingos mining area, all metals were removed in medium percentages (Al: ~ 63%, Zn: ~ 51%, Fe: ~ 52%, Cu: ~ 43% and Mn: ~ 36%); as with the extract of *E. andevalensis*, albeit in lower percentages (Al: ~ 10%, Zn: ~ 16%, Fe: ~ 21%, Cu: ~ 6% and Mn: ~ 1%).

The solvent extraction tests aiming metals recovery from the zinc plating effluent showed that for the extracts of *C. ladanifer* prepared with Shell GTL and Octanol, or only Shell GTL, there was low extraction of Fe (<10%) and no extraction of Zn from the zinc plating effluent. On the other hand, when using ethyl acetate enriched with *C. ladanifer* phenolic compounds, the best yield on phenolic compounds was obtained with 80% (v/v) acetone in acidified water (1.2 M HCl) and there was a direct relationship between the

concentration of phenols in ethyl acetate and the efficiency of iron and zinc extractions (which reached ~ 34% and ~ 56%, respectively). Moreover, in tests with phenolic compounds transferred to ethyl butyrate, butyl acetate, decanol and octanol, extraction efficiencies of Zn and Fe (<25%) were relatively lower for both plants than when ethyl acetate was used.

Keywords:

Plant extracts; metals; acid mine drainage; zinc effluent; solvent extraction

Índice

Agradecimentos	ii
Financiamento	iii
Resumo	iv
Abstract	vi
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiv
1. Introdução	1
1.1. Metais Pesados no ambiente	1
1.2. Drenagem ácida de minas (AMD - Acid mine drainage)	3
1.2.1. Faixa Piritosa Ibérica: Mina de São Domingos	5
1.3. Efluente da zincagem	7
1.4. Plantas hiperacumuladoras de metais	9
1.4.1. Erica andevalensis	11
1.4.2. Cistus ladanifer	13
1.5. Uso de extratos de plantas para recuperação de metais	14
2. Material e Métodos	17
2.1. Descrição global do trabalho experimental	17
2.2. Reagentes e materiais	18
2.3. Equipamentos	18
2.4. Águas contaminadas com metais	19
2.4.1. Águas contaminadas com metais - Caracterização	20
2.5. Material vegetal	21
2.5.1. Material vegetal - Caracterização	22
2.6. Preparação dos extratos hidroalcoólicos e caracterização	22
2.7. Eficiência dos extratos hidroalcoólicos de E. andevalensis e C. ladanifer para recuperação/extração de metais de soluções unimetálicas artificiais e de águas reais contaminadas com metais	23
2.7.1. Soluções artificiais unimetálicas	23
2.7.2. Águas contaminadas com metais	25
2.8. Extração por solvente com compostos de plantas para remoção/recuperação de ferro e zinco do efluente da zincagem	26

2.8.1.	ES com extrato de planta preparado com Shell GTL/ Octanol (Teste 1)	27
2.8.2.	ES com extrato de planta preparado com Shell GTL (Teste 2)	28
2.8.3.	ES com acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos das plantas (Testes 3 a 8)	28
2.8.4.	ES com outros solventes orgânicos enriquecidos com compostos fenólicos das plantas.	32
2.9.	Testes estatísticos	34
3.	Resultados e Discussão	35
3.1.	Caracterização inicial dos efluentes	35
3.2.	Caracterização das plantas e dos extratos hidroalcoólicos	37
3.3.	Capacidade de remoção de metais pelos extratos de <i>C. ladanifer</i> e <i>E. andevalensis</i> em soluções artificiais unimetálicas	39
3.3.1.	<i>Cistus ladanifer</i>	39
3.3.2.	<i>E. andevalensis</i>	43
3.4.	Capacidade de remoção de metais pelos extratos de <i>Cistus</i> e <i>Erica</i> em efluentes contaminados.	46
3.4.1.	Vertido do zincado	46
3.4.2.	AMD	48
3.5.	Extração por solvente (ES)	50
3.5.1.	ES com extrato de <i>C. ladanifer</i> preparado com Shell GTL e Octanol (Teste 1) e apenas com Shell GTL (Teste 2)	50
3.5.2.	ES com acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos de <i>C. ladanifer</i> (Testes 3 a 7)	51
3.5.3.	ES com outros solventes orgânicos enriquecidos com compostos fenólicos de <i>C. ladanifer</i>	54
3.5.4.	ES com outros solventes orgânicos enriquecidos com compostos fenólicos de <i>E. andevalensis</i>	57
4.	Conclusões	59
5.	Perspetivas Futuras	61
6.	Referências	62
Anexos		70
	Anexo I- Médias das concentrações dos metais e os resultados dos testes estatísticos para comparação das mesmas	71
	Anexo II- Valores de pH a partir dos quais é previsível formação de complexos sólidos com os metais em diferentes matrizes obtidos em simulações com o programa informático Medusa-Hydra (Puigdomenech 2015)	73

Lista de Figuras

Figura 1.1- Exemplo de um local com AMD na mina de São Domingos

Figura 1.2- Mapa da área da mina de São Domingos (Abreu et al., 2008)

Figura 1.3- Diagrama representativo de um processo de zincagem ácida. Fonte: Guia Técnico “Sector dos Tratamentos de Superfície” – INETI, 2000

Figura 1.4- Planta *Erica andevalensis* na Mina de São Domingos. (Rossini-Oliva et al., 2018)

Figura 1.5- Planta *Cistus ladanifer*.(Fonte: Jardim Botânico UTAD)

Figura 2.1- Esquema geral do trabalho experimental

Figura 2.2- Local de recolha da água ácida de mina para este trabalho, na zona mineira de São Domingos, Achada do Gamo

Figura 2.3- Recolha de *E. andevalensis* a crescer junto a uma zona de água ácida na mina de São Domingos, Portugal.

Figura 2.4- Esquema simplificado da preparação do extrato das plantas.

Figura 2.5- Esquema do procedimento do uso de extratos de plantas *E. andevalensis* e *C. ladanifer* para remoção de metais de águas contaminadas: AMD e Efluente da indústria da zincagem.

Figura 2.6- Esquema das extrações por solvente de ferro e zinco do efluente da zincagem usando os compostos dos extratos das plantas

Figura 2.7- Eliminação da acetona do extrato no evaporador rotativo

Figura 2.8- Mistura do extrato aquoso com os extratantes

Figura 2.9- Separação das fases após mistura do extrato com os solventes orgânicos. Da esquerda para a direita: decanol, octanol, acetato de etilo, acetato de butilo, Butirato de etilo.

Figura 2.10- Separação das fases após centrifugação de alguns dos solventes: butirato de etilo, acetato de etilo e acetato de butilo (da esquerda para a direita)

Figura 3.1- Remoção de metais pelo extrato de *C. ladanifer* em soluções artificiais unimetais de Zn^{2+} ($C_i = 61,940 \pm 0,009\text{mg/L}$), Fe^{3+} ($C_i = 108,10 \pm 0,06\text{mg/L}$), Mn^{2+} ($C_i = 99,29 \pm 0,04\text{mg/L}$), Cu^{2+} ($C_i = 84,480 \pm 0,003\text{mg/L}$), Pt^{2+} ($C_i = 114,6 \pm 0,1\text{mg/L}$), Pd^{2+} ($C_i = 130,02 \pm 0,05\text{mg/L}$), Al^{3+} ($C_i = 103,98 \pm 0,79\text{mg/L}$) e Au^{3+} ($C_i = 106,40 \pm 0,24\text{mg/L}$) preparadas com 0.01M HCl após 1 hora de contacto e após 48h.

Figura 3.2- - Remoção de metais pelo extrato de *C. ladanifer* em soluções artificiais unimetálicas de Zn^{2+} (Ci= 87,88 ± 0,01 mg/L), Fe^{3+} (Ci=109,85 ± 0,03 mg/L), Mn^{2+} (Ci=121,80 ± 0,02 mg/L), Cu^{2+} (Ci=101,24 ± 0,06 mg/L), Pt^{2+} (Ci= 113,4 ± 0,07 mg/L), Pd^{2+} (Ci= 101,14 ± 0,03 mg/L), Al^{3+} (Ci= 98,6 ± 0,4 mg/L) Ag^+ (Ci=121,5 ± 0,3 mg/L) e Au^{3+} (Ci=107,7 ± 0,2mg/L) preparadas com 0.01M H_2SO_4

Figura 3.3- Remoção de metais pelo extrato de *E. andevalensis* em soluções artificiais unimetálicas de Zn^{2+} (Ci= 61,940 ± 0,009mg/L), Fe^{3+} (Ci=108,10 ± 0,06mg/L), Mn^{2+} (Ci=99,29 ± 0,04mg/L), Cu^{2+} (Ci=84,480 ± 0,003mg/L), Pt^{2+} (Ci= 114,6 ± 0,1mg/L), Pd^{2+} (Ci= 130,02 ± 0,05mg/L), Al^{3+} (Ci= 103,98 ± 0,79mg/L) e Au^{3+} (Ci=106,40 ± 0,24mg/L) preparadas com 0.01M HCl após 1h e 48h de contacto.

Figura 3.4- Remoção de metais pelo extrato de *E. andevalensis* em soluções artificiais unimetálicas Zn^{2+} (Ci= 87,88 ± 0,01 mg/L), Fe^{3+} (Ci=109,85 ± 0,03 mg/L), Mn^{2+} (Ci=121,80 ± 0,02 mg/L), Cu^{2+} (Ci=101,24 ± 0,06 mg/L), Pt^{2+} (Ci= 113,4 ± 0,07 mg/L), Pd^{2+} (Ci= 101,14 ± 0,03 mg/L), Al^{3+} (Ci= 98,6 ± 0,4 mg/L) Ag^+ (Ci=121,5 ± 0,3 mg/L) e Au^{3+} (Ci=107,7 ± 0,2mg/L) preparadas com 0.01M H_2SO_4 , após 1h e 48h de tempo de contacto.

Figura 3.5- Remoção de metais do efluente da zincagem pelos extratos de *E. andevalensis* e *C. ladanifer*

Figura 3.6- Eficiência de remoção de metais da AMD por mistura com extrato hidroalcoólico de *C. ladanifer* na proporção 1:1 (v/v) e reação durante 1 hora.

Figura 3.7- Eficiência de extração de zinco e ferro na extração de solvente a partir do efluente da zincagem usando extratos de *C. ladanifer* preparados com Shell GTL e Octanol (Teste 1) e com apenas Shell GTL (Teste 2) como fases orgânicas.

Figura 3.8- Eficiência da extração de zinco e ferro do efluente da zincagem usando acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos extraídos de *C. ladanifer* com acetona segundo diferentes métodos (Tabela 2.4 nos materiais e métodos).

Figura 3.9- Eficiência da extração de zinco e ferro do efluente da zincagem usando os solventes orgânicos acetato de etilo (EA), butirato de etilo (EB), acetato de butilo (BA), decanol (Dec) e octanol (Oct) enriquecidos compostos de *C. ladanifer*.

Figura 3.10 - Eficiência da extração de zinco e ferro do efluente da zincagem usando os solventes orgânicos acetato de etilo (EA), butirato de etilo (EB), acetato de butilo (BA), decanol (Dec) e octanol (Oct) enriquecidos com compostos de *E. andevalensis*.

Lista de Tabelas

Tabela 1.1- Concentração dos elementos químicos na AMD da mina de S Domingos, adaptado de (Martins et al., 2011)

Tabela 1.2- Concentração de alguns metais no solo da Mina de São Domingos de acordo com diferentes autores (a)(Santos et al, 2014);(b)(Santos et al., 2012); (c) (Abreu et al., 2012); (d)(Freitas et al., 2004).

Tabela 1.3- Concentração de alguns metais pesados mais relevantes no efluente de zincagem ácida utilizado neste trabalho (análises efetuadas no laboratório HIDROLAB, Espanha).

Tabela 1.4- Capacidade de acumulação de metais por plantas consideradas hiperacumuladoras e respetivos recordes globais de acumulação desses elementos por Espécies hiperacumuladoras de acordo com o Banco de Dados Global (a partir de setembro de 2017) Adaptado de (Reeves et al., 2018).

Tabela 1.5- Concentração dos metais nas folhas da *E.andevalensis*, Adaptado de (Rossini-Oliva et al. 2018).

Tabela 1.6- Concentração de alguns metais pesados nas folhas de *Cistus ladanifer* (a)(Santos et al., 2012); (b) (Freitas et al., 2004)

Tabela 2.1- Soluções padrão para calibração dos metais nas técnicas de espectrometria FAAS e MP-AES.

Tabela 2.2- Programa de digestão utilizado no digestor (modelo Discover SP-D 80; marca CEM).

Tabela 2.3- Concentrações iniciais das soluções unimetálicas

Tabela 2.4- Sumário dos procedimentos para a preparação dos solventes orgânicos com compostos das plantas para testes de extração por solvente (ES) com o efluente da indústria da eletrozincagem. S/L significa extração sólido/líquido e L/L extração líquido/líquido

Tabela 3.1- Caracterização da água ácida de mina da área mineira de São Domingos

Tabela 3.2- Caracterização do efluente da indústria da zincagem

Tabela 3.3- Caracterização das folhas das plantas *E. andevalensis* e *C. ladanifer*

Tabela 3.4- Caracterização do extrato hidroalcolólico de *C. ladanifer* e *E. andevalensis*

Tabela 3.5- Valores de pH das soluções iniciais unimetálicas preparadas com 0,01M HCl, e das misturas com o extrato de *C. ladanifer* e controlos após 1 hora e após 48h.

Tabela 3.6- Valores de pH das soluções iniciais unimetálicas preparadas com 0.01M H₂SO₄, e das misturas com o extrato de *C. ladanifer* e controlos após 1 hora e após 48h.

Tabela 3.7- Valores de pH das soluções iniciais unimetálicas preparadas com 0.01M HCl, e das misturas com o extrato de *E. andevalensis* e controlos após 1 hora e após 48h.

Tabela 3.8- Valores de pH das soluções iniciais unimetálicas preparadas com 0.01M H₂SO₄, e das misturas com o extrato de *E. andevalensis* após 1 hora e após 48h.

Tabela 3.9- Valores de pH nas misturas do extrato com o vertido do zincado na proporção 1:1 (v/v) após 1 hora.

Tabela 3.10- Valores de pH nas misturas do extrato com a AMD na proporção 1:1 (v/v) após 1 hora.

Tabela 3.11-Concentrações dos fenóis totais obtidas no etil acetato com diferentes soluções de acetona/água usadas para extrair compostos de *C. ladanifer* para os testes de extração por solvente (ES) no efluente da zincagem. S/L significa extração sólido/líquido e L/L extração líquido/líquido

Tabela 3.12- Concentrações de fenóis totais nas fases orgânicas enriquecidas com os compostos de *C. ladanifer*, e nas fases aquosas após 1 dia .

Tabela 3.13- Características de solubilidade, densidade e polaridade dos solventes orgânicos utilizados na extração dos metais.

Tabela 3.14- Concentrações de fenóis totais nas fases orgânicas enriquecidas com os compostos de *E. andevalensis*.

Lista de Abreviaturas

AMD- água ácida de mina (do inglês: acid mine drainage)

ANOVA- Análise da variância

BA- acetato de butilo

Dec- decanol

EA- acetato de etilo

EB-acetato de butilo

ES- Extração por solvente

FAAS- Espectroscopia de absorção atômica com chama

FPI- Faixa Piritosa Ibérica

L/L- Extração líquido/líquido

MP-AES- Espectroscopia de emissão atômica com plasma de micro-ondas

Oct- Octanol

S/L- Extração sólido/líquido

Objetivos do estudo

O objetivo geral do trabalho é obter extratos aquosos de plantas para serem utilizados em soluções aquosas resultantes de processos anteriores de extração de solventes de metais, e/ou diretamente em efluentes contaminados com metais, como águas ácidas de minas, efluentes da indústria de zincagem e soluções artificiais simuladas visando a separação seletiva do metal ou metais de interesse. Assim, para alcançar este objetivo geral procedeu-se à realização dos seguintes objetivos específicos:

- 1- Fazer uma seleção de plantas com características que sugiram potencial para serem utilizadas para a remoção/recuperação de metais e que estejam localmente disponíveis;
- 2- Selecionar as condições experimentais ótimas para obtenção do extrato aquoso, tendo em consideração a eficiência dos processos face aos objetivos referidos em 1 e uma potencial industrialização dos mesmos;
- 3- Testar a capacidade dos extratos obtidos para a precipitação dos metais de interesse, possibilitando assim a sua remoção ou recuperação dos meios aquosos (efluentes ricos em vários metais como as águas ácidas de minas e efluentes da indústria da eletrozincagem e ainda soluções artificiais unimetálicas);
- 4- Testar a utilização de compostos de plantas, em substituição de conhecidos extratantes químicos, diluídos em solventes orgânicos para remoção/recuperação de metais pela técnica de extração por solvente.

1. Introdução

1.1. Metais Pesados no ambiente

Metais pesados são elementos que exibem propriedades metálicas como ductilidade, maleabilidade, condutividade, estabilidade de cátions e especificidade de ligantes (Chibuike e Obiora, 2014; Raskin et al., 1994). O termo “metal pesado” é muito impreciso pois existem inúmeras definições, que têm em conta diversos parâmetros, tais como, densidade, peso atômico, número atômico, propriedades químicas ou baseada apenas na toxicidade do elemento (Duffus, 2002). Por exemplo, uma das definições encontradas refere-se a metal pesado como um elemento com densidade relativamente alta e alto peso atômico relativo e com um número atômico maior que 20 (Chibuike & Obiora, 2014; Raskin et al., 1994). Em biologia, este termo refere-se a metais ou metaloides que podem ser tóxicos para plantas e animais, mesmo em baixas concentrações (Rascio & Navari-Izzo, 2011).

Os metais pesados incluem o chumbo (Pb), cádmio (Cd), níquel (Ni), cobalto (Co), ferro (Fe), zinco (Zn), crômio (Cr), arsênico (As), prata (Ag), Cobre (Cu), mercúrio (Hg), manganês (Mn), e os elementos do grupo da platina (rutênio-Ru, ródio-Rh, paládio-Pd, ósmio-Os, irídio-Ir, platina-Pt), entre outros (Nagajyoti et al., 2010; Raskin et al., 1994). Apesar de se encontrarem naturalmente presentes no solo, as atividades geológicas e antropogênicas aumentam a concentração desses elementos em quantidades prejudiciais tanto a plantas quanto a animais. (Chibuike & Obiora, 2014; Nagajyoti et al., 2010). As fontes naturais de metais pesados podem ser por exemplo a erosão e atividade vulcânica, enquanto as fontes antropogênicas dependem de atividades humanas como a atividade mineira, o uso de pesticidas e descarga de fertilizantes fosfatados, biossólidos, deposição atmosférica, entre outros (Dixit et al., 2015; Nagajyoti et al., 2010; Elekwachi et al., 2014; Sumner, 2000; Wuana e Okieimen, 2011).

Alguns metais pesados como o Co, o Cu, o Fe, o Mn, o Mo, o Ni, o V e o Zn são necessários em quantidades mínimas pelos organismos, sendo elementos essenciais necessários para o crescimento normal e o metabolismo das plantas. No entanto, quantidades excessivas desses elementos podem-se tornar prejudiciais aos organismos.

Outros metais pesados, como Pb, Cd, Hg e As, não são essenciais, uma vez que não realizam nenhuma função fisiológica conhecida nos organismos e são, portanto, considerados como as “principais ameaças”, uma vez que são muito prejudiciais para plantas e animais, resultando em inibição do crescimento e morte de organismos. No entanto, esta toxicidade de metais pesados nas plantas varia com as espécies vegetais, metal específico, concentração, forma química e composição do solo e pH. (Chibuike & Obiora, 2014; Nagajyoti et al., 2010; Rascio & Navari-Izzo, 2011; Raskin et al., 1994)

Essa fitotoxicidade pode resultar em alterações de numerosos processos fisiológicos causados a nível celular/molecular pela inativação de enzimas, bloqueio de grupos funcionais de moléculas metabolicamente importantes, deslocamento ou substituição de elementos essenciais e interrupção da integridade da membrana. Uma consequência bastante comum da intoxicação por metais pesados é a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS), que expõe as células ao stress oxidativo levando a peroxidação lipídica, deterioração de macromoléculas biológicas, desordenação de membranas, libertação de iões e clivagem do DNA.(Rascio & Navari-Izzo, 2011)

Atualmente, com regulamentações cada vez mais rigorosas, os metais pesados são poluentes prioritários e estão a tornar-se um dos mais graves problemas ambientais. Por outro lado, a ampla gama de aplicações dos metais faz aumentar a sua procura e consequentemente, as suas fontes primárias tendem a diminuir. (Macaskie, et al., 2010) Por estes motivos, a recuperação de fontes secundárias e a sua reutilização são cada vez mais importantes. Portanto, o desenvolvimento de processos visando sua separação eficiente de águas residuais ou soluções resultantes do reprocessamento de diferentes materiais é crucial e assim como a reciclagem de resíduos específicos (por exemplo, catalisadores automotivos usados) (Won et al., 2014).

1.2. Drenagem ácida de minas (AMD - Acid mine drainage)

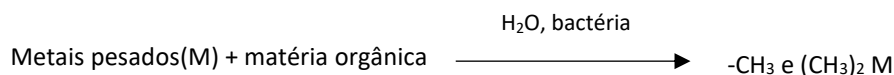
Um dos principais exemplos da presença de metais no solo está relacionado com as atividades mineiras e outros processos geoquímicos que frequentemente resultam na produção de drenagem ácida de minas (AMD) **Figura 1.1** (Nagajyoti et al., 2010). Uma vez exposta à AMD, a qualidade da água degrada-se e, eventualmente, torna-se inadequada para sustentar a biodiversidade. Além disso, os solos expostos também se tornam estruturalmente instáveis e altamente propensos à erosão. (RoyChowdhury et al., 2015)



Figura 1.1- Exemplo de um local com AMD na mina de São Domingos

A AMD é gerada, sob condições oxidantes, quando a pirite (FeS_2) e outros minerais sulfuretados dos locais de mineração atuais e antigos são expostos ao ar e à água. A presença de bactérias oxidantes, como *Thiobacillus ferrooxidans*, também contribui para a geração de AMD (Nagajyoti et al., 2010; Ogwuegbu & Muhanga, 2005), que se caracteriza por baixo pH, altas concentrações de sulfato, ferro e vários elementos potencialmente perigosos libertados durante os processos de oxidação dos sulfuretos. A AMD contribuiu para a acidificação e contaminação de águas superficiais e sedimentos ao longo dos cursos de água nas áreas mineiras (Quental et al., 2002; Rossini-Oliva et al., 2018).

Os metais pesados em locais de mineração são lixiviados e transportados por água ácida. Tanto a atividade bacteriana como a metilação podem agir sobre o metal para produzir formas orgânicas. Esta conversão é efetuada por bactérias na água, na presença de matéria orgânica, de acordo com a seguinte equação simplificada (Nagajyoti et al., 2010).



Devido à alta acidez, a mobilidade dos metais no ambiente aumenta significativamente. O pH extremamente ácido, juntamente com a toxicidade dos metais, pode provocar impactos severos na biodiversidade aquática. Locais de mineração abandonados geralmente aceleram o processo de geração da AMD e podem exigir décadas de práticas de gestão adequadas para total recuperação (RoyChowdhury et al., 2015). As ocorrências da AMD são observadas em várias áreas mineiras da Faixa Piritosa Ibérica (FPI) (Rossini-Oliva et al., 2018). Na **Tabela 1.1** é possível verificar a composição de uma amostra de AMD de uma das minas da FPI, a mina de São Domingos.

Tabela 1.1- Concentração dos elementos químicos na AMD da mina de S Domingos, adaptado de (Martins et al., 2011)

Elemento	Concentração (mg L⁻¹)
As	0,10
Ca	58
Cd	0,12
Co	0,99
Cr	0,08
Cu	28
Fe	70
Hg	<0,01
K	0,30
Mn	7,10
Mo	<0,01
Ni	0,26
Pb	<0,04
Sb	<0,1
Se	<0,007
Sn	<0,1
Sr	0,14
Zn	13
pH	2,8

1.2.1. Faixa Piritosa Ibérica: Mina de São Domingos

A Faixa Piritosa Ibérica (FPI), é uma das províncias de sulfureto maciço mais destacadas do mundo, pois contém mais de 80 depósitos e cerca de 1700 Mt de reservas (Márquez-García et al., 2012; Sáez et al., 1999).

Na FPI, existem várias minas abandonadas que apresentam um forte risco ambiental devido ao alto teor de oligoelementos nos resíduos das minas, solos e sedimentos, e à possível formação de AMD. A contaminação aumenta com a erosão dos resíduos da mina, que na maioria dos casos são instáveis. Para além disso, a lixiviação também pode ser responsável pela propagação de contaminação, especialmente se a fração disponível de oligoelementos em materiais residuais, solos ou sedimentos representar uma alta ou moderada percentagem da concentração total dos elementos (Adriano et al., 2004; Santos et al., 2012).

A mina de São Domingos, (**Fig. 1.2**) é uma mina de cobre abandonada localizada na FPI, no sudeste de Portugal onde se iniciou a atividade mineira na época pré-romana com exploração de Ag, Cu e Au, principalmente no gossan resultante da oxidação da massa de sulfureto.

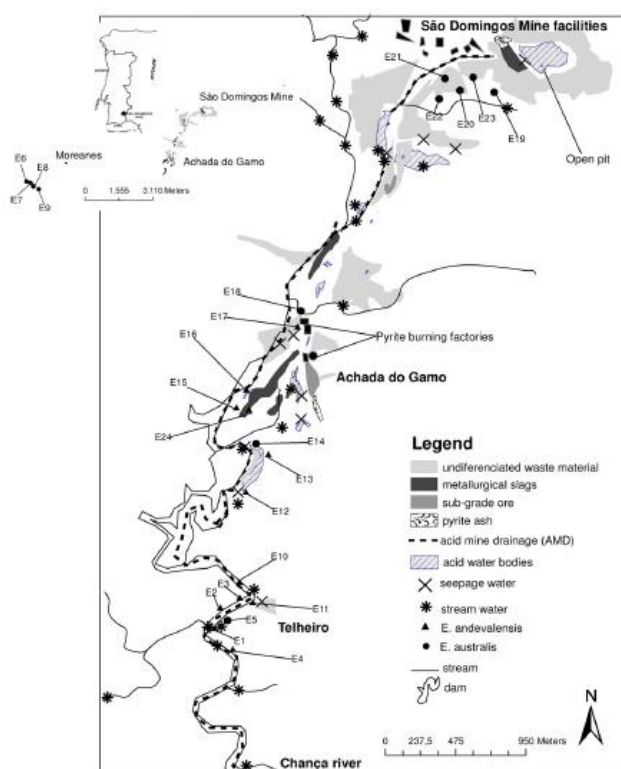


Figura 1.2- Mapa da área da mina de São Domingos (Abreu et al., 2008)

Durante a exploração moderna que teve início no século XIX, a exploração baseou-se tanto no gossan como no sulfeto maciço que continha Cu e algum Zn e Pb, e terminou em 1966 devido ao esgotamento do minério. Os resíduos da mina na área são estimados em várias centenas de milhares de toneladas, o que originou graves problemas ambientais (Quental et al., 2002).

Nesta área, várias espécies de plantas têm sido descritas como tolerantes a metais que estão presentes em solos locais em alguns casos em altas concentrações (**Tabela 1.2**) devido a essas atividades de mineração passadas, com especial relevância para a planta *Erica andevalensis* e a *Erica australis* (Abreu et al., 2008; Márquez-García et al., 2012). Estas plantas, que crescem espontaneamente nestes locais, fornecem importantes contribuições para a reabilitação natural dos mesmos. (Abreu e Magalhães, 2009; Adriano et al., 2004)

Tabela 1.2 - Concentração de alguns metais no solo da Mina de São Domingos de acordo com diferentes autores ^(a)(Santos et al, 2014);^(b)(Santos et al., 2012); (c) (Abreu et al., 2012); (d)(Freitas et al., 2004).

Elemento Químico	Concentração (mg/Kg peso seco)				MAV*
As	1,4×10 ^{3(a)}	2643,33 ± 610,11 ^(b)	1845 ^(c)	392,6 ^(d)	12
Cu	287 ^(a)	226,00 ± 14,18 ^(b)	694 ^(c)	553,2 ^(d)	63
Mn	259 ^(a)	-	293 ^(c)	-	-
Ni	30 ^(a)	-	-	42,2 ^(d)	50
Pb	1,9x10 ^{3(a)}	7343,33 ± 1972,37 ^(b)	5901 ^(c)	2693,7 ^(d)	140
Zn	137 ^(a)	43,33 ± 11,85 ^(b)	294 ^(c)	218,2 ^(d)	200
Fe	83,1 ^(a)	-	57 ^(c)	-	-
pH	4,7 ^(a)	4,53 ± 0,19 ^(b)	4,5 ^(c)	5,06 ^(d)	-

*MAV (maximum allowed values): valores máximos permitidos para solos com uso residencial, de acordo com as Diretrizes de Qualidade do Solo Canadense para a Proteção do Meio Ambiente e Saúde Humana (CCME, 2007)

1.3. Efluente da zincagem

Os efluentes gerados por diferentes indústrias, incluindo acabamento de metais, galvanoplastia, metais não ferrosos, veículos automóveis, geralmente contêm iões de metais pesados em concentrações muito superiores aos níveis permitidos em descargas de efluentes (Bojic et al., 2009).

A metalização é um dos principais processos químicos que descartam grandes quantidades de águas residuais nocivas e tóxicas. As águas residuais de metalização contêm metais pesados (Fe, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn, etc.) e podem conter cianeto, óleo e sólidos suspensos em níveis, que podem ser considerados perigosos para o meio ambiente e podem representar riscos para a saúde pública (Bojic et al., 2009; Hosseini et al., 2016; Kobya et al., 2016).

Os metais pesados e o cianeto, em particular, são de grande preocupação devido à sua toxicidade. O processo de revestimento de metal geralmente envolve limpeza alcalina, decapagem ácida, revestimento e enxaguamento. Grandes quantidades de águas residuais são geradas por essas etapas, especialmente durante os processos de enxaguamento. O uso industrial de zinco aumentou devido ao uso extensivo de sais de zinco e zinco nas indústrias de galvanoplastia e acabamento de metais (Hosseini et al., 2016; Kobya et al., 2016).

Os processos de zincagem mais utilizados são a zincagem por imersão a quente em zinco fundido e a eletrozincagem que pode ser em banho alcalino não cianídrico, banho alcalino cianídrico, ou em banho ácido ou de cloreto de zinco (**Fig.1.3**) (Kobya et al., 2016; Naik e Venkatesha, 2003; Naik et al., 2002).

Para o presente estudo o efluente utilizado foi de um processo de zincagem ácida. Os banhos de zinco ácidos contêm cloreto de zinco (15–38 g/l), cloreto de potássio, cloreto de amónia ou ácido bórico e aditivos exclusivos. No processo de eletrozincagem, a água municipal é geralmente usada na lavagem do solvente, alcalino e ácido, enquanto a água desionizada é utilizada para o enxaguamento, isto é, para o último processo de lavagem (Kobya et al., 2016; Naik e Venkatesha, 2003; Naik et al., 2002). Durante este processo de limpeza ou galvanização, a água nos banhos de enxaguamento fica contaminada devido ao "arrastamento" dos banhos de processos anteriores. Existem 5

lavagens na zincagem ácida que ocorrem após cada passo desse processo: desgorduramento químico, decapagem química, desgorduramento eletrolítico, ativação/neutralização e zincagem ácida (**Figura 1.3**). O desgorduramento químico utiliza solventes orgânicos ou soluções aquosas de sais alcalinos e aditivos, gerando assim um efluente contaminado com esses compostos. De seguida, na decapagem química para eliminação da camada de óxidos presentes nas superfícies das peças utiliza-se uma solução ácida pelo que o resultante da lavagem será uma solução ácida com produtos orgânicos e metais dissolvidos. No desgorduramento eletrolítico há formação de efluentes aquosos com agentes molhantes, que diminuem a tensão superficial do banho, e complexantes e resíduos de óleos e gorduras, e na ativação/neutralização soluções ácidas (INETI, 2000). (**Figura 1.3**) Depois de todos os processos, na água da última lavagem, após zincagem, geralmente as concentrações de zinco variam de 0,112 a 252mg /L (Koby et al., 2016).

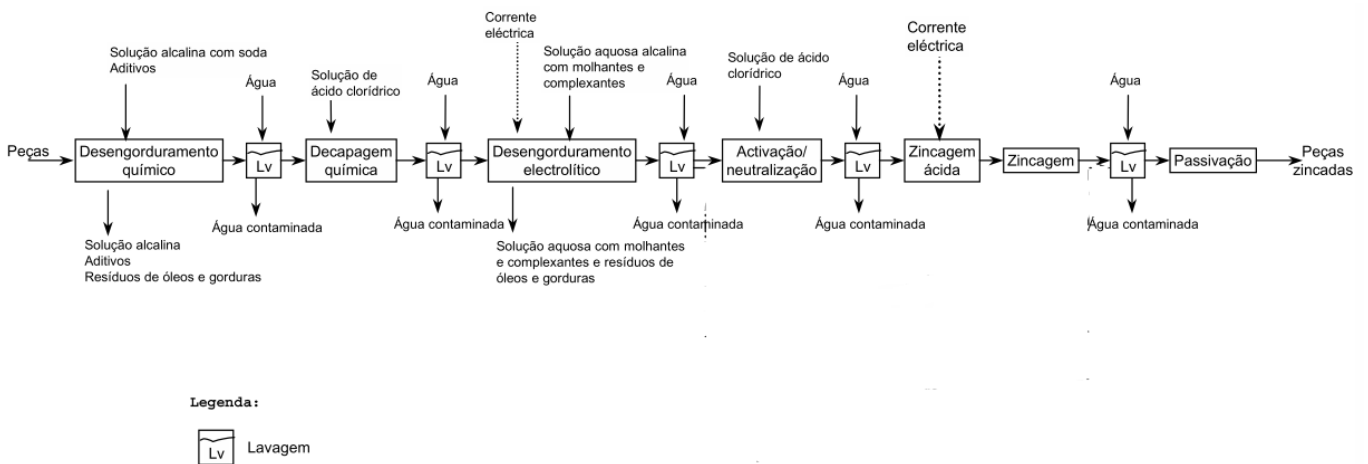


Figura1.3- Diagrama representativo de um processo de zincagem ácida. Fonte: Guia Técnico “Sector dos Tratamentos de Superfície” – INETI, 2000

A **Tabela 1.3** mostra um exemplo da concentração de metais pesados num efluente de zincagem ácida. O zinco, apesar de ser um oligoelemento essencial para a saúde humana, importante para as funções fisiológicas do tecido vivo e regulação de muitos processos bioquímicos, também pode causar problemas de saúde quando presente em altas concentrações, como cólicas estomacais, irritação da pele, vômitos, náusea e anemia (Fu & Wang, 2011; Koby et al., 2016). Várias técnicas têm sido aplicadas para o tratamento de metais pesados a partir de águas residuais, tais como precipitação

química, adsorção, troca iônica, eletrodialise, osmose reversa e eletrocoagulação (Kobya et al., 2016).

Tabela 1.3- Concentração de alguns metais pesados mais relevantes no efluente de zincagem ácida utilizado neste trabalho (análises efetuadas no laboratório HIDROLAB, Espanha).

Metal	Concentração (ug/l)
Fe	111000
Cu	1180
Cr	4030
Zn	345000
Mn	1040
Al	384
pH	<2

1.4. Plantas hiperacumuladoras de metais

O termo hiperacumulador é dado a plantas que absorvem quantidades excessivamente grandes de um ou mais metais presentes no solo comparativamente com as plantas não acumuladoras (Prasad 2014; Rascio and Navari-Izzo 2011; Raskin et al. 1994; Reeves et al. 2018). Uma das definições propõe que uma planta é hiperacumuladora quando contém mais de 0,1% de Ni, Co, Cu, Cr e Pb ou 1% de Zn nas folhas numa base de peso seco, independentemente da concentração de metal no solo (Chibuike & Obiora, 2014; Raskin et al., 1994). Esses metais pesados podem não ficar retidos nas raízes, já que são normalmente translocados para a parte aérea e acumulados em órgãos acima do solo, especialmente folhas, em concentrações que podem chegar a ser centenas ou milhares de vezes superiores às encontradas em espécies não hiperacumuladoras (Rascio & Navari-Izzo, 2011; Reeves et al., 2018).

Uma característica importante que torna a hiperacumulação possível é a tolerância dessas plantas a concentrações crescentes desses metais (hipertolerância), através da exclusão desses metais ou da compartimentação desses íons metálicos; ou seja, os metais são retidos nos compartimentos vacuolares ou nas paredes celulares e, portanto, não têm acesso a locais celulares onde ocorrem funções vitais, como respiração e divisão celular (Chibuike & Obiora, 2014; Garbisu & Alkorta, 2003). Uma característica muito interessante é que os passos mais importantes da hiperacumulação não dependem de novos genes, mas dependem de genes comuns a hiperacumuladores e não-hiperacumuladores, que são expressos e regulados de maneira diferente nos dois tipos de plantas (Rascio & Navari-Izzo, 2011; Verbruggen et al., 2009).

Geralmente, uma planta pode ser chamada de hiperacumuladora se atende aos seguintes critérios: (i) a concentração de metal na parte aérea deve ser maior que 0,1% para Al, As, Co, Cr, Cu, Ni e Se, maior que 0,01% para Cd, e maior que 1,0% para Zn; (ii) a razão entre a concentração da parte aérea e a raiz deve ser consistentemente maior que 1; isso indica a capacidade de transportar metais das raízes para as folhas, a existência de capacidade de hipertensão e o grau de absorção de metal pela planta. (Chibuike & Obiora, 2014)

As características únicas das plantas hiperacumuladoras também são exploradas em biotecnologias aplicadas, como a fitominação e fitorremediação (Roger D. Reeves et al., 2018; van der Ent et al., 2015).

A maioria das espécies hiperacumuladoras descritas (~ 80%) acumulam níquel (Krämer, 2010; Sobczyk et al., 2017; Verbruggen et al., 2009), e encontram-se distribuídas pela Região Mediterrânea, principalmente com espécies do género *Alyssum* (*Brassicaceae*), e Brasil, Cuba, Nova Caledônia e Sudeste Asiático, especialmente com espécies do género *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*) (Reeves 2003; Roger D. Reeves et al. 2018). A espécie *Alyssum serpyllifolium* representa o exemplo mais bem estudado de hiperacumulação facultativa de níquel (Sobczyk et al., 2017). A **Tabela 1.4** mostra alguns exemplos de plantas hiperacumuladoras.

Tabela 1.4- Capacidade de acumulação de metais por plantas consideradas hiperacumuladoras e respetivos recordes globais de acumulação desses elementos por Espécies hiperacumuladoras de acordo com o Banco de Dados Global (a partir de setembro de 2017) Adaptado de (Reeves et al., 2018).

Elemento	Critério de concentração para hiperacumulação (µg/g)	Recorde Global
Arsénico(As)	> 1000	<i>Pteris vittata</i> ¹ (2.3%)
Cádmio (Cd)	> 100	<i>Arabidopsis halleri</i> ² (0.36%)
Chumbo (Pb)	> 1000	<i>Noccaea rotundifolia subsp. cepaeifolia</i> ⁷ (0.8%)
Cobalto (Co)	> 300	<i>Haumaniastrum robertii</i> ⁴ (1%)
Cobre (Cu)	> 300	<i>Aeolanthus biformifolius</i> ³ (1.4%)
Manganês (Mn)	> 10 000	<i>Virotia neurophylla</i> ⁵ (5.5%)
Níquel (Ni)	> 1000	<i>Berkheya coddii</i> ⁶ (7.6%)
Zinco (Zn)	> 3000	<i>Noccaea caerulescens</i> ⁸ (5.4%)

¹(Ma et al., 2001); ²(Stein et al., 2017); ³(Malaisse et al. 1978); ⁴(Brooks, 1977); ⁵(Jaffre et al., 1979); ⁶(Mesjasz-Przybyłowicz et al., 2004); ⁷(Reeves & Brooks, 1983); ⁸(Reeves et al., 2001)

1.4.1. *Erica andevalensis*

A espécie *Erica andevalensis* Cabezudo Rivera (**Fig. 1.4**) é um arbusto perene de 80 a 1500 cm (Cabezudo, B., Rivera, 1980). A família *Ericaceae* contém mais de 80 géneros e cerca de 2800 espécies, que podem ser encontrados no sul da África, América do Norte, Himalaias e sudeste da Europa (Abreu e Magalhães, 2014; Monaci et al., 2011; Rossini-Oliva et al., 2018).



Figura 1.4- Planta *Erica andevalensis* na Mina de São Domingos. (Rossini-Oliva et al., 2018)

No sul de Espanha, *E. andevalensis* pode ser encontrada nas margens dos rios Tinto e Odiel, bem como em rejeitos de minas e solos ácidos (pH <3,5) particularmente contaminados com As, Cu, Fe, Pb e Zn (Monaci et al., 2011; Rossini-Oliva et al., 2018). Também cresce em Portugal, apenas na área da mina de São Domingos, onde tem sido encontrada em solos desenvolvidos em sedimentos fluviais, que transportam água ácida, bem como em solos localizados longe das margens dos rios (Abreu et al., 2008; Quental et al., 2002; Rossini-Oliva et al., 2018). A espécie foi classificada como ameaçada pelo Governo Regional da Andaluzia e representa um bom organismo modelo para estudar a tolerância ao stress abiótico em ambientes extremos. As espécies podem ser encontradas formando populações mais ou menos isoladas ou podem crescer em associação com *Erica australis* e algumas outras espécies de plantas (Rossini-Oliva et al., 2018).

A característica mais interessante de *E. andevalensis* é a capacidade de crescer em condições muito hostis para a vida, como solos com valores de pH entre 3 e 4 e altos teores de elementos tóxicos como Al, Pb, Fe, As e Sb. Ambas estas espécies de *Erica*, mesmo nos solos não contaminados, são tolerantes ao Al e acumuladoras de Mn ((Abreu

et al., 2008; Rossini-Oliva et al., 2018). A **Tabela 1.5** mostra a concentração de alguns destes metais nas folhas de *E. andevalensis*.

Os compostos fenólicos, que são importantes agentes redutores e quelantes, particularmente de Cu e Fe, e possuem propriedades antioxidantes (Cruces et al., 2016; Rossini-Oliva et al., 2018), são abundantes nas plantas de *Ericaceae* e parecem ter funções alelopáticas e antioxidantes. Foram encontradas baixas concentrações de compostos fenólicos e reduzida atividade antioxidante em *E. andevalensis* em comparação com outras espécies do género *Erica* (*E. australis*, *E. arborea*) coletadas em áreas mineiras. Estes resultados levaram os autores a sugerir que nem a atividade antioxidante nem os níveis fenólicos desempenham um papel importante em *E. andevalensis* para tolerar altas concentrações de metais e metalóides nos solos (Márquez-García e Córdoba, 2009; Rossini-Oliva et al., 2018).

Por todas as razões expostas, *E. andevalensis* e *E. australis* podem ser consideradas de grande importância para a recuperação das áreas de mineração de sulfuretos em regiões com condições climáticas compatíveis com o melhoramento e o crescimento dessas espécies de plantas (Abreu et al., 2008) e poderão ter potencial em processos de biorremediação e de biorrecuperação envolvendo metais.

Tabela 1.5- Concentração dos metais nas folhas de *E. andevalensis*, Adaptado de (Rossini-Oliva et al. 2018).

Metal		Concentração (mg/Kg)			
Al	175 ^(a)	231 ^(b) (145–426)	535,8 ^(c) (182–2314)	-	200–2000 ^(e)
As	-	4,08 ^(b) (0.07–24)	13,13 ^(c) (3–43)	0,41–6,85 ^(d)	-
Cd	-	0,01 ^(b) (0.01–0.03)	-	-	-
Cu	12 ^(a)	5,43 ^(b) (2.5–10)	10,4 ^(c) (4.05–38.3)	9,49– 16,43 ^(d)	11–22 ^(e)
Fe	185 ^(a)	237 ^(b) (97–541)	1282 ^(c) (268–5639)	73,3– 514,3 ^(d)	40–2000 ^(e)
Mn	1234 ^(a)	1839 ^(b) (302–2935)	597 ^(c) (256–1129)	-	496–1598 ^(e)
Pb	-	7,30 ^(b) (0.50–37)	35,1 ^(c) (3.05–262)	0,77–9,80 ^(d)	19–260 ^(e)
Zn	13 ^(a)	16,5 ^(b) (1.65–45)	23,9 ^(c) (11.2–43.4)	12,2–27,8 ^(d)	29–673 ^(e)

(a)(Soldevilla et al, 1992); (b) (Monaci et al., 2011); (c)(Abreu et al., 2008); (d) (Rodríguez et al., 2007); (e) (Durães et al., 2015)

1.4.2. *Cistus ladanifer*

Cistus ladanifer L. (**fig. 1.5**) é uma das espécies espontâneas da FPI consideradas promissoras para a fitoestabilização de áreas de mineração (Abreu, M.M. 2011; Santos et al., 2016, 2012). Cresce tanto em solos não contaminados como contaminados das áreas de mineiras da FPI (Santos et al., 2012).



Figura 1.5- Planta *Cistus ladanifer*.(Fonte: Jardim Botânico UTAD)

Este arbusto é uma planta pioneira, bem adaptada ao clima mediterrânico, a baixo pH e poucos nutrientes no solo (Díez Lázaro et al., 2006; Santos et al., 2012).

C. ladanifer desenvolveu vários mecanismos de tolerância, que permitem a sua adaptabilidade a ambientes contaminados (**Tabela 1.6**). Exemplos desses mecanismos de adaptabilidade são: imobilização de elementos metálicos nas raízes, acumulação nas folhas senescentes, manutenção de baixas concentrações de oligoelementos nas folhas jovens que aparecem na primavera, presença de sistemas de defesa antioxidantes eficazes baseados em enzimas e translocação de azoto para jovens folhas, onde é reutilizado, durante a senescência (Durães et al. 2015; Abreu et al. 2011; Santos et al. 2009, 2014, 2016, 2013).

Independente da área da mina e das características do solo, *C. ladanifer* coloniza os solos contaminados mostrando ter grande capacidade de tolerância e adaptabilidade às condições limitantes para o crescimento da vegetação (Santos et al., 2016).

Tabela 1.6- Concentração de alguns metais pesados nas folhas de *Cistus ladanifer*
(a)(Santos et al., 2012); (b) (Freitas et al., 2004)

Metal	Concentração (mg/Kg peso seco)	
As	1,67 ± 0,17 ^(a)	2,1 ^(b)
Cu	8,23 ± 0,63 ^(a)	13,4 ^(b)
Pb	55,79 ± 6,30 ^(a)	11,0 ^(b)
Zn	147,88 ± 10,14 ^(a)	170,1 ^(b)

1.5. Uso de extratos de plantas para recuperação de metais

Como já foi referido anteriormente, existem várias técnicas para o tratamento de metais pesados a partir de águas residuais, tais como precipitação química, adsorção, troca iónica, eletrodiálise, osmose reversa e eletrocoagulação (Dixit, A. e Dixit S., 2015; Kobya et al., 2016). No entanto esses métodos têm algumas desvantagens, tais como a produção de grandes resíduos sólidos secundários, altos custos de capital, químicos e operacionais (Dixit et al., 2015; Azmi et al., 2018; Kobya et al., 2016; Yavuz et al., 2003).

Cada vez mais existe uma maior consciencialização para os problemas ambientais e conseqüentemente mais restrições legais impostas à descarga de efluentes, portanto é essencial a necessidade de novas tecnologias alternativas eficazes e sustentáveis para o tratamento dos efluentes (Dixit et al., 2015; Azmi et al., 2018).

Uma das técnicas utilizadas é a extração líquido-líquido, também conhecida como extração por solvente (ES), que é um método simples e popular usado para a separação de metais pesados de soluções aquosas (Woller, et al., 1996). Consiste no contacto entre a solução aquosa metálica e um solvente orgânico insolúvel, com o objetivo de extrair os iões metálicos da fase aquosa e passá-los para a fase orgânica. Os metais ficam assim distribuídos entre as duas fases, que serão separadas com base na diferença de densidades (Patil, et al., 2013).

A utilização de extratos vegetais também mostra ser uma alternativa para o tratamento de efluentes pois estes têm na sua constituição compostos que podem atuar como agentes redutores/antioxidantes, ou seja, eliminam os radicais livres, agentes

quelantes dos íons metálicos e que doam átomos de hidrogênio ou elétrons, e desta forma protegem e estabilizam/imobilizam as partículas metálicas (Ahmad et al., 2010; Azmi et al., 2018; Mohamad et al., 2013). Exemplos desses compostos podem ser os compostos fenólicos que são sintetizados nas plantas como resposta a alterações ecológicas e fisiológicas, como ataque de patógenos e insetos, radiação UV e ferimentos (Chung, et al., 2003; Napal, et al., 2010; Kennedy e Wightman, 2011; Khoddami, et al., 2013). A característica estrutural básica dos compostos fenólicos é um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilo. (Chirinos et al., 2009; Khoddami et al., 2013). Os compostos fenólicos de plantas são classificados como fenóis simples ou polifenóis com base no número de unidades de fenol na molécula. Assim, os fenóis vegetais incluem fenóis simples, cumarinas, ligninas, lignanas, taninas condensadas e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonóides (Soto-Vaca, et al., 2012). Os flavonóides são alguns dos compostos fenólicos mais comuns, amplamente distribuídos nos tecidos das plantas. A família flavonóide inclui flavonas, flavonóides, isoflavonóides, antocianinas, antocianidinas, proantocianidinas e catequinas (Ferreira e Pinho, 2012; Khoddami et al., 2013; Tsao, 2010).

Diversos estudos mostraram a capacidade que alguns desses compostos têm para quelar metais como por exemplo os estudos de Karamac, 2007 e 2009, em que usaram compostos vegetais purificados e secos misturados diretamente com as soluções metálicas mostrando que os taninos obtidas de trigo sarraceno conseguem quelar íons de ferro, cobre e zinco e que os taninos de sementes de nozes, avelãs e amêndoas eram capazes de quelar os íons de cobre e ferro, enquanto os íons de zinco só eram ligados significativamente pelo tanino de amêndoa e avelã.

Existem vários métodos estabelecidos para a extração de polifenóis de materiais vegetais. Esses métodos variam em solventes e condições utilizadas. O método de extração é essencial para a quantificação precisa do conteúdo e da capacidade antioxidante. (Allothman, et al., 2009; Naczk e Shahidi, 2004, 2006)

A extração de compostos fenólicos em materiais vegetais é influenciada pela sua natureza química, método de extração, tamanho de partícula da amostra, tempo e condições de armazenamento, e também da presença de substâncias interferentes. Eles também podem existir como complexos com carboidratos, proteínas e outros componentes vegetais; alguns fenóis de alto peso molecular e seus complexos podem ser

bastante insolúveis. Portanto, extratos fenólicos de materiais vegetais são sempre uma mistura de diferentes classes de fenólicos que são solúveis no sistema solvente utilizado (Naczk e Shahidi, 2004; Robbins, 2003). A solubilidade dos compostos fenólicos depende do tipo de solvente (polaridade) utilizado, grau de polimerização dos fenóis, bem como a sua interação com outros constituintes da planta e formação de complexos insolúveis. Portanto, não existe um procedimento específico ou completamente satisfatório que seja adequado para a extração de todos os fenóis ou de uma classe específica de substâncias fenólicas em materiais vegetais. Normalmente utiliza-se metanol, etanol, acetona, água, acetato de etilo e, em menor escala, propanol, dimetilformamida e suas combinações para a extração de fenóis (Antolovich, Prenzler, Robards, e Ryan, 2000; Naczk e Shahidi, 2004).

2. Material e Métodos

2.1. Descrição global do trabalho experimental

De forma a atingir os objetivos mencionados anteriormente, o presente trabalho experimental dividiu-se em duas partes: uma em que se adicionou diretamente o extrato das plantas a águas contaminadas com metais e soluções metálicas artificiais; e uma segunda parte em que se usou os compostos das plantas em solventes orgânicos para remoção/recuperação de metais pela técnica de extração por solvente. O esquema geral destes procedimentos encontra-se esquematizado na **figura 2.1**.

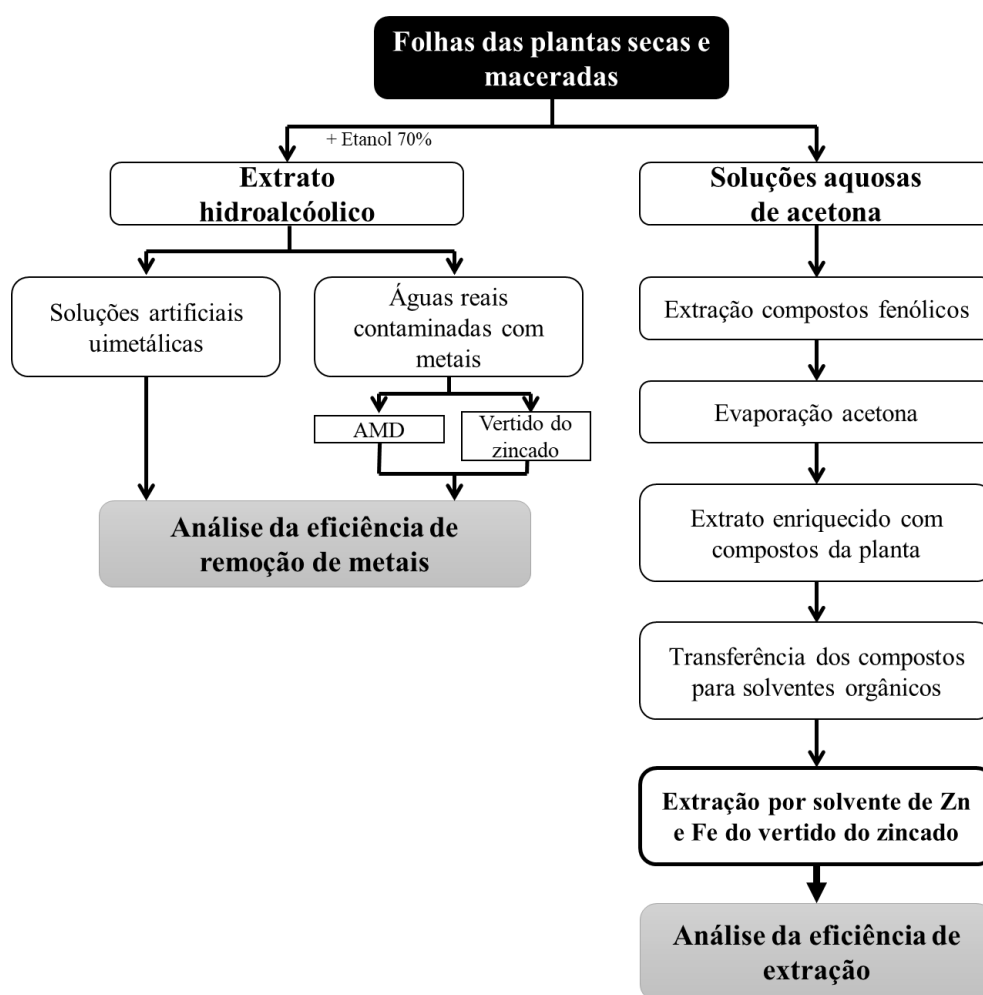


Figura 2.1- Esquema geral do trabalho experimental

2.2. Reagentes e materiais

Para a preparação de soluções metálicas artificiais utilizaram-se padrões de 1000mg/L dos seguintes metais:

- Alumínio $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ em 0.5M HNO_3 (Merck Certipur®, Alemanha);
- cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0.5M HNO_3 (Merck Certipur®, Alemanha);
- ferro $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0.5M HNO_3 (Merck Certipur®, Alemanha);
- Manganês $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 0.5M HNO_3 (Panreac AA, Espanha);
- Ouro $\text{H}(\text{AuCl}_4)$ em HCl 2M (Merck Certipur®, Alemanha);
- Paládio $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 0.5M HNO_3 (Merck Certipur®, Alemanha);
- Zinco $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 0.5M HNO_3 (Merck Certipur®, Alemanha);
- Prata Ag em HNO_3 5% (Alfa Aesar, Alemanha) e
- Platina em HCl 5% (SIGMA-ALDRICH standard for AAS, EUA).

Outras soluções também utilizadas ao longo das experiências foram: ácido clorídrico 37% (Merck Certipur®, Alemanha), Ácido nítrico 65% (PanReac AppliChem, ITW Reagents), ácido sulfúrico 96% (PanReac AppliChem, ITW Reagents), solução de peróxido de hidrogénio $\geq 30\%$ (SIGMA-ALDRICH) e Etanol 96%.

Para as extrações por solvente o Octanol (Acros Organics), decanol (Merck Certipur®, Alemanha), acetato de etilo (Merck Certipur®, Alemanha), acetato de butilo (VWR International Laboratory Chemicals), butirato de etilo (Acros Organics), shell GTL solvente GS 215 e acetona foram utilizados como solvente orgânicos.

2.3. Equipamentos

Ao longo da realização deste trabalho experimental utilizaram-se vários equipamentos com diferentes finalidades, tais como, Espectrofotómetro de absorção atómica com chama (FAAS, novAA 350, Analytik Jena, Jena, Alemanha) para análise da concentração de Zn, Fe, Cu, Mn, Pd e Pt e o Espectrofotómetro de emissão atómica com plasma de micro-ondas (MP-AES, Agilent Technologies 4200, Estados Unidos) para as concentrações de Al, Au e Ag. A mufla aquecida por micro-ondas (modelo Phoenix Microwave Muffle; marca CEM) e o digestor aquecido por micro-ondas e pressurizado

(modelo Discover SP-D 80; marca CEM) foram utilizados para o passo de caracterização do material vegetal. Nos passos intermédios utilizou-se também os seguintes equipamentos: Placa de agitação (heidolph, MR Hei-Tec) para a homogeneização da misturas, medidor de pH (Crison GLP 21), Banho de ultrassons (sonicação) (Fisherbrand, FB15054) utilizado durante a preparação dos extratos para provocar lise celular e o evaporador rotativo para os testes de extração por solvente, para evaporação de acetona.

2.4. Águas contaminadas com metais

As águas contaminadas com metais utilizadas neste trabalho foram a água ácida de mina (AMD) e um efluente da indústria da zincagem. A AMD foi recolhida na mina de São Domingos, no concelho de Mértola, em outubro de 2018, numa lagoa na zona da Achada do Gamo de contaminação extrema devido a ciclos sazonais de enchimento em consequência da chuva e evaporação graças às elevadas temperaturas de verão na região (**Figura 2.2**). Já o efluente da indústria da zincagem (designado de vertido do zincado) foi obtido em setembro 2014 na linha de galvanização ácida de zinco na industrial Goñabe, uma indústria dedicada aos serviços metalização de superfícies metálicas localizada em Valladolid, Espanha.



Figura 2.2- Local de recolha da água ácida de mina para este trabalho, na zona mineira de São Domingos, Achada do Gamo.

2.4.1. Águas contaminadas com metais - Caracterização

Antes de começar qualquer ensaio com os efluentes, tanto a AMD como o efluente da zincagem foram caracterizados no seu conteúdo em metais usando as técnicas de espectroscopia atômica de absorção com chama (FAAS, novAA 350, Analytik Jena, Jena, Alemanha) e espectroscopia de emissão atômica com plasma de micro-ondas (MP-AES, Agilent Technologies 4200, Estados Unidos). Analisou-se também o pH, concentração de sulfatos e cloretos. Para cada efluente, os metais analisados foram aqueles que normalmente são conhecidos por estar em maior abundância neste tipo de águas. Portanto, foram analisados por FAAS o Cu, Zn, Fe, Cr e Mn para ambas as águas e para a AMD foi também analisada a concentração de Al por MP-AES.

Para a calibração de cada metal foram preparadas soluções padrão, cujas concentrações se encontram na **tabela 2.1**. Todos estes padrões foram preparados usando 5% ácido nítrico como matriz, que também é utilizado para o branco. Numa parte posterior do trabalho em que se utilizam soluções unimetálicas, serão analisados também Pd e Pt por FAAS e os metais Ag e Au por MP-AES, motivo pelo qual esses metais também se encontram na **tabela 2.1**.

Tabela 2.1- Soluções padrão para calibração dos metais nas técnicas de espectrometria FAAS e MP-AES.

Metal	Técnica	Comprimento de onda (nm)	Padrões de calibração (mg/L)
Cu	FAAS	324,8	0/ 0,1/ 0,5/ 1/ 3/ 5/ 7,5/ 10
Zn	FAAS	213,9	0/ 0,05/ 0,2/ 0,5/ 0,75/ 1
Fe	FAAS	248,3	0/ 0,25/ 0,5/ 1/ 3/ 5/ 7,5
Mn	FAAS	279,5	0/ 0,05/ 0,1/ 0,5/ 1,5/ 2
Al	MP-AES	396,1	0/0,1/1/5/10/25/50/75/100
Pt	FAAS	265,9	0/5/10/20/30/40/50
Pd	FAAS	244,8	0/2/4/6/8/10
Au	MP-AES	267,6	0/2,5/5/10/30/50
Ag	MP-AES	328,1	0/2,5/5/10/30/50

A medição do potencial redox (Eh) e do pH foi feita no medidor de pH /E GLP 21 (Crison). Para determinar a concentração de sulfato utilizou-se o espectrofotômetro UV-Visível DR2800 (Hach-Lange), usando os procedimentos sulfaVer4 (Método 8051,

Hach-Lange) a 450 nm. Por fim, determinou-se a concentração de cloretos por titulação volumétrica.

2.5. Material vegetal

Os dois tipos de folhas de plantas para este estudo foram também recolhidos na área de mineração de São Domingos em outubro de 2018, nomeadamente folhas de *Cistus ladanifer* L. e folhas de *Erica andevalensis* Cabezudo & Rivera. As folhas de *C. ladanifer* foram colhidas numa zona circundante de lagoas e canais com AMD mas afastada o suficiente para não ser afetada diretamente por águas ácidas. Por outro lado, as folhas de *E. andevalensis* foram recolhidas de arbustos que cresciam junto a uma lagoa de AMD com valores de pH entre 3 e 4 (**Figura 2.3**).

A escolha das plantas adequadas a este trabalho, teve em conta alguns critérios como estar disponíveis na região, estar reportadas como acumuladoras de metais e/ou serem plantas (ou partes destas) consideradas resíduos industriais ou agrícolas que estejam disponíveis e cuja valorização seria um valor acrescentado. As plantas selecionadas foram *Erica andevalensis* Cabezudo & Riviera (um arbusto que cresce nas margens de águas ácidas de mina e acumula metais)- **Figura 2.3** e *Cistus ladanifer* L. (a conhecida esteva que cresce na região mediterrânica e é parte da biomassa resultante das limpezas de mato preventivas de incêndios), as quais foram recolhidas na mina de São Domingos.



Figura 2.3- Recolha de *E. andevalensis* a crescer junto a uma zona de água ácida na mina de São Domingos, Portugal.

As folhas jovens e maduras foram colhidas, selecionadas e imediatamente secas em estufa a 45°C para *C. ladanifer* e 40°C para *E. andevalensis*, até que seus pesos estabilizassem para remover a humidade. As folhas secas foram então transformadas em pó usando um moedor de café elétrico.

2.5.1. Material vegetal - Caracterização

Ambos os tipos de material vegetal foram caracterizados quanto ao seu conteúdo em metais. A mineralização das folhas de *C. ladanifer* e *E. andevalensis* para análise de metais fez-se em dois passos. Primeiro 0,5 g de folhas secas e maceradas foram levadas a cinzas numa mufla aquecida por micro-ondas (modelo Phoenix Microwave Muffle; marca CEM) a 600°C durante 30 minutos. De acordo com informação disponibilizada pela marca, esta estufa permite aplicações 97% mais rápidas que as estufas tradicionais (<http://cem.com/phoenix>).

Depois, para garantir total mineralização do material obtido no primeiro passo, este foi dissolvido em 7,5 mL de ácido nítrico concentrado (65%) + 2,5 mL de peróxido de hidrogénio (30%) e digerido num sistema de digestão aquecido por micro-ondas e pressurizado (modelo Discover SP-D 80; marca CEM) em tubos de quartz de 80 mL com o programa descrito na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2 – Programa de digestão utilizado no digestor (modelo Discover SP-D 80; marca CEM).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (mm:ss)	Tempo da etapa (mm:ss)	Pressão (PSI)	Agitação com magneto
1	ambiente	-	00:15	<50	Média
2	90	02:00	02:00	250	Média
3	190	06:00	05:00	300	Média
4	230	10:00	05:00	300	Média

2.6. Preparação dos extratos hidroalcoólicos e caracterização

O pó obtido das plantas foi misturado, na proporção de 1:10 (w/v), com 70% de etanol em água, e deixado a sonicar durante 1 hora. Após isso ficou em agitação *overnight* a 150 rpm. Por fim esse extrato foi centrifugado 5 min a 2500g, descartou-se o *pellet*, o sobrenadante foi filtrado num sistema de vácuo com papel de filtro (papel de filtro qualitativo, 310-150mm; VWR) e fez-se a medição do pH do extrato. Este procedimento foi feito para cada uma das plantas, *E. andevalensis* e *C. ladanifer*, obtendo-se no final dois extratos distintos (**Figura 2.4**).

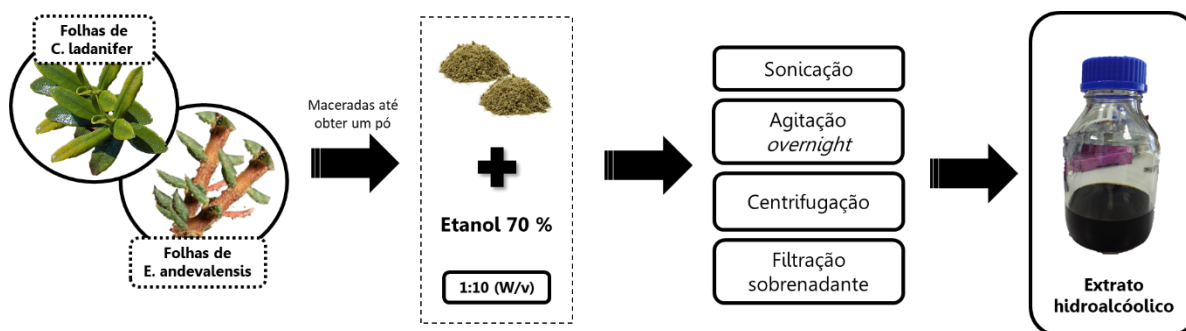


Figura 2.4 - Esquema simplificado da preparação do extrato das plantas.

Cada extrato foi analisado para determinar a concentração de metais. Para isso diluiu-se 1mL de extrato em 4mL de 5% de HNO₃. No entanto esta diluição levou à formação de precipitados, os quais foram digeridos com adição de 2,5 mL de HNO₃ 65% e 2,5mL de peróxido de hidrogénio 30% e aquecimento em banho-maria a 70°C durante 1h. Por fim, foram preparadas as restantes diluições necessárias e então analisados os metais Zn, Fe, Cu, Mn e Al em cada extrato digerido.

2.7. Eficiência dos extratos hidroalcoólicos de *E. andevalensis* e *C. ladanifer* para recuperação/extração de metais de soluções unimetálicas artificiais e de águas reais contaminadas com metais

2.7.1. Soluções artificiais unimetálicas

Neste primeiro ensaio os objetivos foram os seguintes: (1) preparação das soluções artificiais unimetálicas em 0.01M H₂SO₄ e 0.01M HCl; (2) testar a eficiência de extração dos metais pelos extratos das plantas *E. andevalensis* e *C. ladanifer* em cada uma das soluções com diferentes tempos de contacto: 1h e 48h. Para cada metal foram feitos triplicados, e controlos que foram preparados sem adicionar extrato, apenas com solução unimetálica e etanol 70%. No final os metais foram analisados por FAAS e MP-AES, de forma a calcular a eficiência de remoção.

Partindo de soluções stock de 1000mg/L foram preparadas para cada metal duas soluções de Zn (II), Cu (II), Al (III), Fe (III), Mn(II); Pt(II); Pd(II), Au(III) e Ag(I) , uma

das soluções numa matriz de 0.01M HCl e a outra em 0.01M H₂SO₄, cujas concentrações finais estão na **Tabela 2.3**. A prata apenas foi analisada para a solução com matriz de H₂SO₄ porque quando preparada com HCl precipita e os resultados não seriam fidedignos.

Tabela 2.3- Concentrações iniciais das soluções unimetálicas preparadas em 0.01M HCl e 0.01M H₂SO₄

Conc. Inicial (mg/L)	Zn (II)	Fe (III)	Mn (II)	Cu (II)	Pt (II)	Pd (II)	Al (III)	Au (III)	Ag (I)
0,01M HCl	61,940 ± 0,009	108,10 ± 0,06	99,29 ± 0,04	84,480 ± 0,003	114,6 ± 0,1	130,02 ± 0,05	103,98 ± 0,79	106,40 ± 0,24	-
0,01M H₂SO₄	87,88 ± 0,01	109,85 ± 0,03	121,80 ± 0,02	101,24 ± 0,06	113,4 ± 0,07	101,14 ± 0,03	98,6 ± 0,4	107,7 ± 0,2	121,5 ± 0,3

A cada uma destas soluções unimetálicas foi adicionado, numa proporção de 1:1(v/v), o extrato hidroalcoólico da planta que foi preparado como descrito anteriormente. Seguiu-se o mesmo procedimento para o extrato das duas plantas. Homogeneizou-se as misturas e após 1 hora de contacto, centrifugou-se 5 min a 2500g, recolheu-se o sobrenadante e mediu-se o pH. Após 48h voltou a centrifugar-se as soluções, recolheu-se novamente o sobrenadante e mediu-se o pH, como anteriormente. Antes da análise dos metais diluiu-se 1mL de cada amostra em 4mL de 5% HNO₃, e como houve formação de precipitados, estes foram digeridos adicionando-se às amostras diluídas 2,5mL de HNO₃ 65% e 2,5 mL de H₂O₂ 30% e aquecendo-as em banho-maria a 70°C durante 1 hora.

Após este processo passou-se às análises por FAAS e MP-AES e por fim calculou-se as eficiências de remoção (ou lixiviação) dos metais pelas plantas, para cada amostra, a partir da eq. 1.

$$\text{Eficiência de remoção/lixiviação (\%)} = 100 \times \frac{C_i - C_f}{C_i} \quad (1)$$

Em que, C_i corresponde à concentração inicial do metal na mistura do extrato hidroalcoólico da planta com a solução unimetálica e C_f representa a concentração final de metal na mistura. Neste caso, para uma mistura de 1:1 (v:v) e considerando apenas o fator de diluição (assumindo ausência de metais no extrato da planta), C_i = [solução

unimetalica] x 0,5. Por outro lado, a um valor positivo corresponde remoção de metal, enquanto a um valor negativo corresponde lixiviação.

2.7.2. Águas contaminadas com metais

Nesta secção o objetivo foi testar a eficiência de remoção dos metais utilizando os extratos hidroalcoólicos das plantas *E. andevalensis* e *C. ladanifer* em águas reais, nomeadamente o efluente da indústria da zincagem e AMD. (**Figura 2.5**).

Após obtenção dos extratos de *E. andevalensis* e *C. ladanifer* como já foi descrito anteriormente, estes foram adicionados às águas contaminadas (efluente da zincagem/AMD) numa proporção 1:1(v/v), de seguida agitou-se para homogeneizar e manteve-se a mistura à temperatura ambiente durante 1 hora sem agitação. Os passos seguintes de centrifugação, medição do pH, diluição e digestão dos precipitados foram realizados da mesma forma aos descritos na secção anterior (soluções artificiais unimetalicas).

Por fim as soluções foram analisadas por FAAS e MP-AES para determinar a concentração de metais: para o vertido do zincado, foram analisados Zn e Fe e para o extrato de *E. andevalensis* também se analisou a concentração de Mn. Nos testes com AMD analisou-se os metais Zn, Fe, Cu, Mn e Al, para ambos os extratos. As eficiências de remoção ou lixiviação dos metais pelas plantas, para cada amostra, foram determinadas também a partir da Eq. 1.

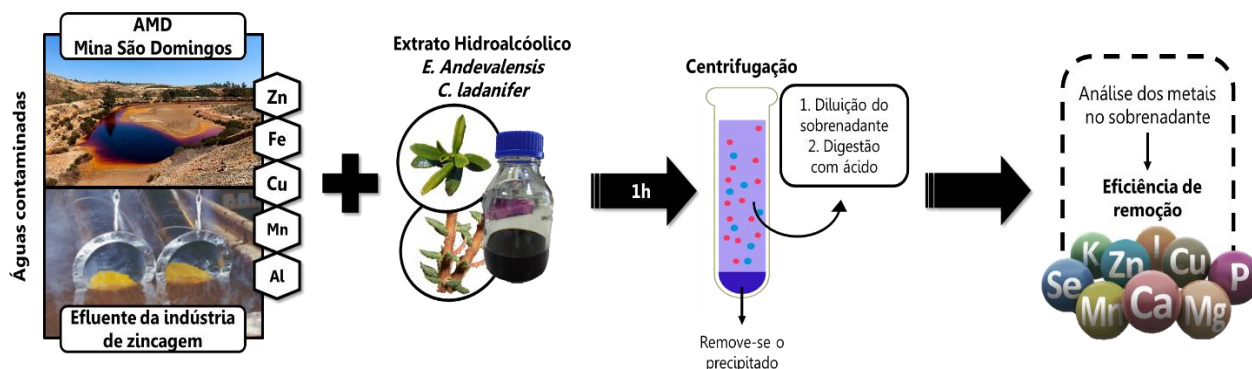


Figura 2.5- Esquema do procedimento do uso de extratos de plantas *E. andevalensis* e *C. ladanifer* para remoção de metais de águas contaminadas: AMD e Efluente da indústria da zincagem.

2.8. Extração por solvente com compostos de plantas para remoção/recuperação de ferro e zinco do efluente da zincagem

A abordagem inovadora aqui testada consiste na utilização de compostos de plantas, em substituição de conhecidos extratantes químicos geralmente tóxicos, diluídos em solventes orgânicos para remoção/recuperação de metais pela conhecida técnica de extração por solventes (ES).

Os testes de ES foram realizados usando 3 replicados para cada condição de extração e, para todos os testes, os metais principais presentes no efluente da zincagem foram analisados na fase aquosa antes e depois do contacto com o solvente orgânico contendo os compostos da planta a ser testados como extratantes de metais.

As concentrações de metais foram analisadas por espectroscopia de absorção atômica (FAAS, novAA 350, Analytik Jena, Germany) e a eficiência de transferência dos metais foi calculada como descrito na eq 2.

$$\text{Eficiência de transferência do metal} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100\% \quad (2)$$

Os procedimentos realizados para preparar os solventes orgânicos enriquecidos com compostos de plantas usados nos testes de extração por solvente com o efluente da zincagem estão sumarizadas na **tabela 2.4**.

Tabela 2.4- Sumário dos procedimentos para a preparação dos solventes orgânicos com compostos da planta para testes de extração por solvente (ES) com o efluente da indústria da eletrozincagem. S/L significa extração sólido/líquido e L/L extração líquido/líquido

Teste ES	Descrição resumida da preparação das fases orgânicas para a ES
1	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 50% (v/v) Shell GTL / octanol
2	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em Shell GTL
3	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 50% (v/v) acetona / água destilada, seguido de evaporação da acetona. L/L: Extrato sem acetona / Acetato de etilo 1:1 (v/v) para transferência dos compostos das plantas
4	S/L: 10% (v/v) resíduo sólido do teste 3 em 50% (v/v) acetona / água acidificada (1.2M HCl) L/L: 50% (v/v) Extrato sem acetona / Acetato de etilo para transferência dos compostos das plantas.
5	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 50% (v/v) Acetona / água acidificada (1.2M HCl) L/L: 50% (v/v) Extrato sem acetona / Acetato de etilo para transferência dos compostos das plantas.
6	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 65% (v/v) Acetona / água acidificada (1.2M HCl) L/L: 50% (v/v) Extrato sem acetona / Acetato de etilo para transferência dos compostos das plantas.
7	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 80% (v/v) Acetona / água acidificada (1.2M HCl) L/L: 50% (v/v) Extrato sem acetona / Acetato de etilo para transferência dos compostos das plantas.
8	Os controlos das extrações por solvente foram realizados com acetato de etilo puro.

2.8.1. ES com extrato de planta preparado com Shell GTL/ Octanol (Teste 1)

O primeiro teste foi realizado com o extrato de *C. ladanifer* preparado com um solvente fluido parafínico usado para ES de metais (Shell GTL solvent GS 215) misturado com octanol. Primeiro, 20g de folhas secas e moídas foram suspensas em 200 mL de Shell GTL/Octanol (50/50 V/V) seguido de 5 minutos de agitação. Depois a mistura foi sonicada 1 hora (mantendo-se a temperatura abaixo de 40°C com gelo no banho do sonificador) e de seguida homogenizada durante toda a noite com agitação magnética. Posteriormente foi centrifugada a 2500g durante 5 min e o sobrenadante foi decantado e filtrado (papel de filtro qualitativo, 310;150mm; VWR) sob vácuo parcial para remover as partículas sólidas. Este sobrenadante foi o extrato da planta seguidamente utilizado como solvente orgânico para os testes de ES de zinco e ferro do efluente da zincagem: 15

mL de extrato de planta foi adicionado a 15 mL de vertido do zincado num balão de fundo redondo aberto e ficou sob agitação 1 hora; depois a mistura foi transferida para um funil de decantação para separar a fase orgânica e aquosa e as eficiências de remoção calculadas como descrito anteriormente na equação 2.

2.8.2. ES com extrato de planta preparado com Shell GTL (Teste 2)

No segundo teste o extrato de *C. ladanifer* foi preparado só com o solvente parafínico fluido usado na secção 2.6.1 (Shell GTL solvent GS 215). 20 g de folhas secas e moídas foram suspensas em 200 mL de Shell GTL seguido de 5 min de agitação magnética. Os passos seguintes de sonicação, centrifugação e filtração para preparar os extratos e os procedimentos para realizar os testes de ES são iguais aos descritos na secção 2.8.1.

2.8.3. ES com acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos das plantas (Testes 3 a 8)

Uma vez que é conhecido que os compostos fenólicos das plantas conseguem quelar metais (Karamac, 2007 e 2009), foi realizada uma nova série de experiências para a extração do Zn e/ou Fe, tentando-se assim tirar vantagem desta característica. Com esse objectivo: (1) diferentes tipos de soluções aquosas de acetona foram testadas para extrair os compostos fenólicos das folhas de *C. ladanifer*; (2) depois a acetona foi evaporada do extrato obtido usando um evaporador rotativo a 30°C; (3) os compostos fenólicos foram transferidos dos extratos aquosos (que resta após evaporada a acetona) para o acetato de etilo por ES, e por fim (4) o acetato de etilo foi usado para os testes de ES de zinco e ferro no efluente da zincagem. Nesta série de experiências, com o objetivo de estudar também a relação do conteúdo de compostos fenólicos com a eficiência de recuperação de metais, a concentração dos fenóis totais foi analisada no acetato de etilo enriquecido com os compostos das plantas. A concentração dos fenóis totais foi determinada usando o método 4-nitroanilina (Kit LCK 346 (5-200 mg/L), Hach-Lange).

Os testes de ES com diferentes tipos de soluções aquosas de acetona usadas para extrair os compostos fenólicos foram os seguintes:

Teste 3: com o objetivo de extrair os compostos fenólicos livres, 20 g de folhas secas em pó foram suspensas em 100 mL de 50 % (v/v) de acetona em água destilada. A mistura foi sonicada (mantendo-se a temperatura abaixo de 40°C com gelo no banho do sonicador) por 1 h e depois agitada num agitador orbital por 2h. Depois foi centrifugada a 2500 g por 5 min e a fase líquida foi filtrada (papel de filtro qualitativo, 310-150mm; VWR) e recolhida. 100 mL adicionais de acetona 50% (v/v) foram adicionados ao resíduo sólido resultante da centrifugação e a mistura agitada durante 2h. Após isso foi centrifugada e filtrada como já descrito anteriormente e recolhida uma segunda fase líquida. Ambas as fases líquidas foram misturadas e colocadas no evaporador rotativo com banho a 30°C para eliminar a acetona. Depois, o extrato sem acetona foi adicionado a acetato de etilo num rácio de 1:1 (v/v) em balões de fundo redondo abertos e homogeneizou-se durante 2h por agitação magnética. O acetato de etilo carregado com os compostos da planta foi então usado como fase orgânica para os testes de ES com o efluente da zincagem como descrito na secção 2.6.1.

Teste 4: com o objetivo de extrair os compostos fenólicos ligados (covalentemente ligados a açúcares ou componentes estruturais da parede celular), 100 mL de 50% (v/v) de acetona em água acidificada com 1.2M de HCl foi adicionada ao resíduo sólido resultante do teste 3 e agitado durante a noite. A mistura foi então centrifugada e filtrada como já descrito anteriormente de forma a recolher a parte líquida. Mais 100 mL de 50% (v/v) de acetona em água acidificada com 1.2M de HCl foi adicionada ao resíduo sólido resultante da centrifugação e deixado a agitar toda a noite. Depois foi centrifugado e filtrado como já foi descrito e recolheu-se uma segunda fase líquida. Os procedimentos seguintes foram iguais aos descritos no teste 3.

Teste 5: com o objetivo de simultaneamente extrair os compostos fenólicos livres e ligados 40g de folhas secas moídas foram diretamente suspensas em 200 mL de 50% (v/v) de acetona em água acidificada (1.2M de HCl). A mistura foi sonicada por 1h e depois ficou em agitação 2h, após isso foi centrifugada e filtrada como descrito anteriormente e a fase líquida foi recolhida. Mais 200 mL de 50% (v/v) de acetona em água acidificada (1.2M de HCl) foram adicionados ao resíduo sólido resultante da centrifugação e depois agitado toda a noite, centrifugado e filtrado como já foi descrito e por fim recolhida a segunda fase líquida. Os procedimentos seguintes foram iguais aos descritos no teste 4.

Teste 6: com o objetivo de melhorar a extração dos compostos fenólicos e a recuperação dos metais do efluente da indústria da zincagem, os procedimentos do teste 5 foram repetidos, mas usou-se 65% (v/v) de acetona em água acidificada (1.2 M HCl)

Teste 7: ainda com o objetivo de melhorar a extração dos compostos fenólicos e a recuperação dos metais do efluente da indústria da zincagem, os procedimentos do teste 5 foram repetidos, mas usou-se 80% (v/v) de acetona em água acidificada (1.2 M HCl). Neste caso, depois da mistura do extrato sem acetona com o acetato de etilo num rácio de 1:1 (v/v) foi necessário adicionar água (1 volume) para permitir a separação das fases orgânica e aquosa.

Teste 8: Como forma de controlo foi realizado um teste de SX apenas com acetato de etilo puro misturado com efluente da zincagem.

Na **Figura 2.6** pode ver-se os testes efetuados de extração por solvente de metais do vertido do zincado de forma esquematizada.

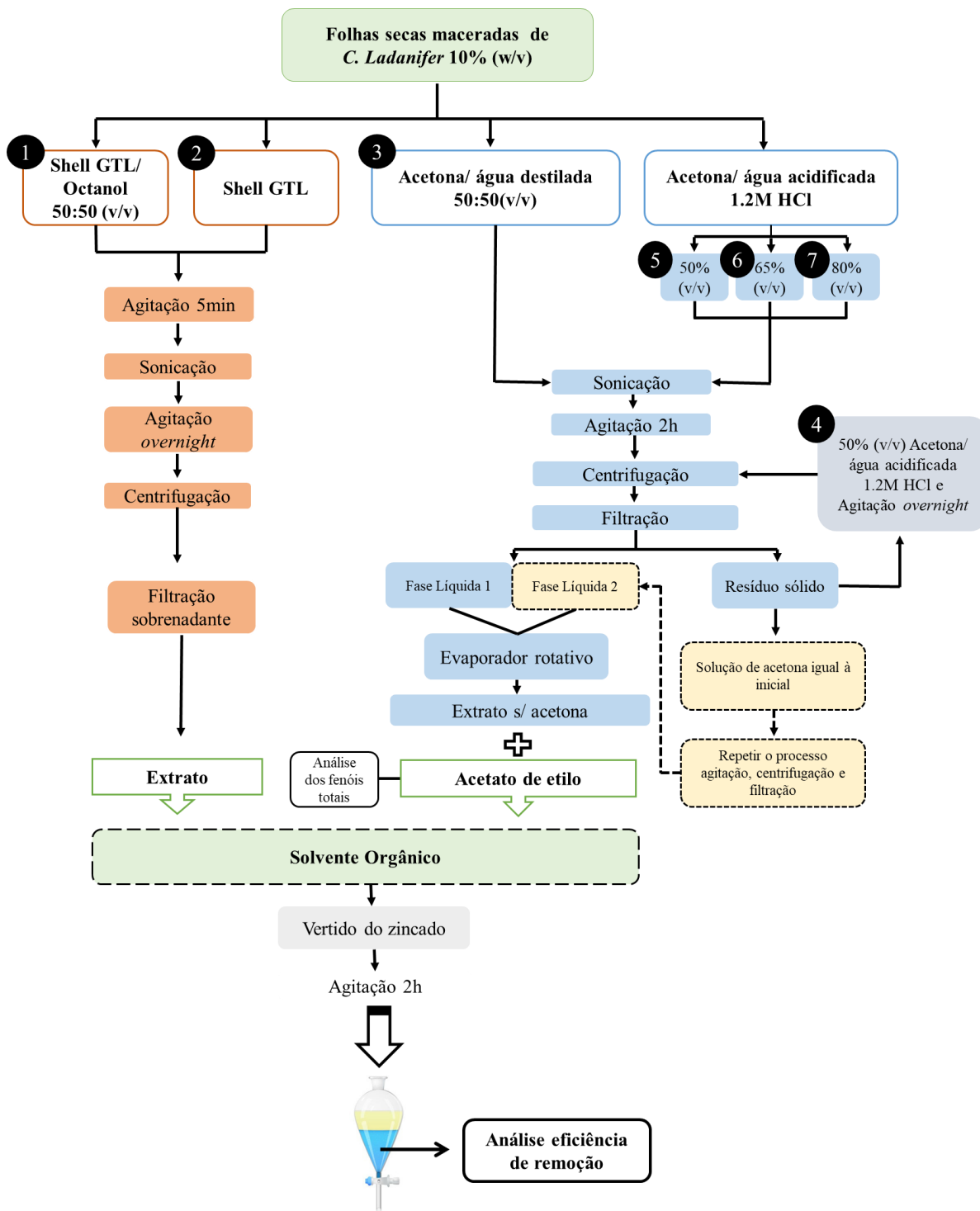


Figura 2.6- Esquema das extrações por solvente de ferro e zinco do efluente da zincagem usando os compostos dos extratos das plantas (Testes 1 a 7)

2.8.4. ES com outros solventes orgânicos enriquecidos com compostos fenólicos das plantas.

Nesta experiência o procedimento é bastante semelhante ao do teste 7 (descrito na secção anterior), mas desta vez o objetivo foi testar vários solventes orgânicos com solubilidades em água (SA) inferiores à do acetato de etilo (SA = 85,3 g/L) para eluir os compostos fenólicos das plantas após extração com acetona, nomeadamente butirato de etilo (SA = 0,21 g/L), acetato de butilo (SA = 5,3 g/L), decanol (SA = 0,02 g/L) e octanol (SA = 0,3 g/L). Como referência fez-se também o procedimento com acetato de etilo, repetindo-se o teste 7. Estes testes foram realizados para ambos os extratos das plantas, *E. andevalensis* e *C. ladanifer*.

O procedimento foi semelhante ao do teste 7: 20% (w/v) do pó das folhas secas de *C. ladanifer* foi adicionado a uma solução contendo 80% de acetona e 20% de 1.2M HCl. A mistura foi sujeita a sonicação durante 1h e depois homogeneizada por 2h, após isso, foi centrifugada a 2500g por 5min e a fase líquida filtrada e guardada a 4°C. Aos resíduos sólidos resultantes da centrifugação foi novamente adicionada uma solução de acetona e 1,2M HCl e de seguida homogeneizada durante a noite. Repetiu-se o processo de centrifugação a 2500g, 5min e filtração do sobrenadante. Esta fase líquida é adicionada à obtida anteriormente. Toda a fase líquida foi colocada no evaporador rotativo a 35°C para eliminar a acetona (**Figura 2.7**).

Após isto, o extrato aquoso é então misturado aos extratantes (acetato de etilo, butirato de etilo, acetato de butilo, decanol ou octanol) num rácio de 1:1 (v/v) e homogeneizado por 2h (**Figura 2.8**). Depois centrifugou-se 5 min a 2500g, separaram-se as fases (**Figuras 2.9 e 2.10**) e analisou-se os fenóis totais em ambas as fases. Para a determinação da concentração de fenóis totais da fase aquosa e orgânica utilizou-se o método 4-nitroanilina (Kit lck 346 (5-200 mg/L), Hach-Lange), segundo o método II descrito no kit. Para a fase aquosa fizeram-se diluições em água destilada para se ter valores no intervalo de leitura do kit. No caso da fase orgânica, fizeram-se diluições de 1:10 em acetato de etilo. Como controlo negativo (“brancos”) da análise de fenóis utilizou-se (i) nun caso água destilada e (ii) no outro caso os respetivos solventes puros diluídos 1:10 em acetato de butilo puro.



Figura 2.7- Eliminação da acetona do extrato no evaporador rotativo



Figura 2.8- Mistura do extrato aquoso com os extratantes

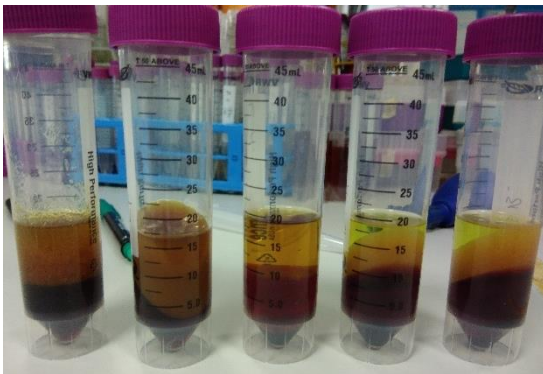


Figura 2.9- Separação das fases após mistura do extrato com os solventes orgânicos. Da esquerda para a direita: decanol, octanol, acetato de etilo, acetato de butilo, Butirato de etilo.

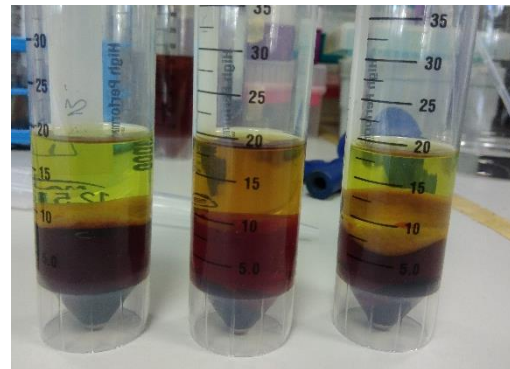


Figura 2.10- Separação das fases após centrifugação de alguns dos solventes: butirato de etilo, acetato de etilo e acetato de butilo (da esquerda para a direita)

Para os testes de ES de metais, a fase orgânica é por fim misturada ao efluente da zincagem numa proporção 1:1 (v:v) e homogeneizada durante 1h. As fases são separadas e as fases aquosas são recolhidas para análise dos metais por FAAS.

Para o extrato de *E. andevalensis* repetiu-se o mesmo processo, mas os fenóis totais foram medidos apenas na fase orgânica diluída em etil acetato 1:10 (v/v). No final só se analisou a fase aquosa colhida imediatamente após a separação da fase orgânica depois da mistura e homogeneização durante 1h.

2.9. Testes estatísticos

A significância das diferenças entre as médias das concentrações de metais nos diferentes tratamentos experimentais (teste 1h, teste 48h, controle 1h e controle 48h) foi avaliada pela análise de variância fatorial (ANOVA), considerando um nível de significância de 5%. Assim, quando a ANOVA revelou diferenças significativas entre os tratamentos, foram realizados testes *post-hoc* com os testes de Tukey Kramer (também para nível de significância de 5%).

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização inicial dos efluentes

A caracterização da água recolhida na mina de São Domingos mostrou que este efluente é rico em metais, mas de entre eles, o ferro destaca-se por se encontrar em maior quantidade, numa concentração de 55240 ± 3670 mg/L. Para além do ferro, o alumínio, cobre e zinco também se encontram com valores de concentração muito elevados (**Tabela 3.1**).

Apesar destes metais serem geralmente os indicados em maiores concentrações, as concentrações medidas nesta amostra não estão em concordância com os valores reportados noutras amostras deste tipo de água colhidas na Mina de São Domingos. Por exemplo, Martins et al., (2011) reportou concentrações de 13 mg/L de Zn, 70 mg/L para o ferro e 28 mg/L de Cu, valores muito mais baixos que os medidos na amostra utilizada neste trabalho (mencionados na **tabela 3.1**). Esta discrepância de valores pode ser explicada pelo facto de que a AMD para o presente estudo foi recolhida em outubro, logo após o Verão, e a lagoa onde foi obtida enche com a chuva na estação fria e durante toda a estação quente fica estagnada a evaporar e tornando-se assim muito concentrada em metais.

Tabela 3.1- Caracterização da água ácida de mina da área mineira de São Domingos

Parâmetro	Caracterização	Unidades
Cu	4603 ± 69	mg/L
Zn	2589 ± 31	
Fe	55240 ± 3670	
Mn	$123,9 \pm 0,2$	
Cr	$2,7 \pm 0,1$	
Al	6221 ± 125	
Cl ⁻	22,5	g/L
SO ₄ ²⁻	157,2	
pH	1,19	Sorensen scale
Eh	469	mV

O outro efluente utilizado neste trabalho, a água residual da zincagem da Indústria Goñabe (**Tabela 3.2**) também mostrou ter vários metais na sua composição, no entanto o metal em destaque é o zinco com 386 ± 2 mg/L, valor um pouco acima do reportado pela EPA (Environmental Pollution Control Alternatives), 1985 em que as concentrações neste tipo efluente geralmente variam entre 0,112 a 252 mg/L, por outro lado, para o ferro reportaram valores entre 0,410 a 1,482 mg/L valores muito abaixo dos obtidos neste estudo uma vez que o ferro foi o metal que logo após o Zn, obteve maior valor de concentração ($123,4 \pm 0,4$ mg/L). Já noutro estudo de Ghorpade e Ahmmed, 2017, os valores de zinco obtidos num efluente ácido da eletrozincagem foram significativamente mais elevados, na ordem de 972,3 mg/L.

Uma vez que o Zn e Fe foram os metais encontrados em maior concentração, foram esses os metais analisados nas experiências com este vertido do zincado.

Tabela 3.2- Caracterização do efluente da indústria da zincagem

Parâmetro	Caracterização	Unidades
Zn	386 ± 2	
Fe	$123,4 \pm 0,4$	
Cu	$2,66 \pm 0,03$	mg/L
Cr	$2,12 \pm 0,06$	
Mn	$1,59 \pm 0,02$	
SO₄²⁻	0,049	
Cl⁻	1,04	g/L
pH	2,1	Sorensen scale
Eh	501	mV

3.2. Caracterização das plantas e dos extratos hidroalcoólicos

Os resultados obtidos da mineralização das folhas das plantas *C. ladanifer* e *E. andevalensis* podem ser analisados na **tabela 3.3**. Ambas as plantas mostraram ter metais acumulados nas suas folhas, nomeadamente Zn, Fe, Cu, Mn e Al. Os que se encontram em menor concentração são o Zn e Cu.

Estes valores obtidos estão em concordância com o intervalo de valores reportados em diversos estudos como por exemplo o de Santos et al. (2012), Anawar et al., (2011), Freitas et al., (2004), Abreu et al., (2008) e Monaci et al., (2011).

Santos et al. (2012) reportou que as folhas de *C. ladanifer* na mina de São Domingos podem acumular iões de zinco até 147,88 mg/kg peso seco e, segundo Anawar et al., (2011), as concentrações de ferro podem chegar a valores na ordem de 345 mg/kg peso seco. Em relação ao cobre, foram obtidos resultados muito semelhantes aos reportados por Freitas et al., 2004, que obteve valores médios deste metal de 13,4 mg/kg.

No caso das folhas de *E. andevalensis* da área mineira de São Domingos, Abreu et al., 2008 reportou uma acumulação média de ferro de 1282 mg/kg e 23,9 mg/kg para o zinco, 597mg/kg para manganês e de 535,8mg/kg para alumínio. Já para o cobre os valores obtidos estão em concordância com os reportados por Monaci et al., 2011 que obteve uma concentração média de 5,43 mg/kg.

Tabela 3.3- Caracterização das folhas das plantas *E. andevalensis* e *C. ladanifer*

Metal	Concentração mg/Kg de peso seco	
	<i>C. ladanifer</i>	<i>E. andevalensis</i>
Zn	17,29 ± 0,02	17,220 ± 0,009
Fe	677,80 ± 0,04	1350,0 ± 0,1
Cu	13,43 ± 0,01	3,860 ± 0,006
Mn	790,00 ± 0,03	394,56 ± 0,02
Al	380,00 ± 0,06	400,00 ± 0,03

Pode também verificar-se a capacidade de *E. andevalensis* de acumular quantidades muito superiores de ferro comparativamente à *C. ladanifer*. Isto provavelmente está relacionado ao facto de que a primeira apenas crescer muito próximo

da água ácida das minas, em solos altamente contaminados com metais (nas margens de água ácida de minas). Já a segunda cresce na zona da mina em solos contaminados, mas mais longe das águas altamente contaminadas e também em solos não contaminados. No entanto, os pesquisadores provaram que *C. ladanifer* é capaz de sobreviver e crescer em solos com altas concentrações de íons de ferro e também zinco, e que esta planta é adequada para a fitoestabilização de solos de minas (Santos et al., 2012; Alvarenga et al., 2004) devido à presença de atividade enzimática catalase, peróxido e superóxido dismutase nas folhas de *C. ladanifer* (Santos et al., 2009). Assim, os constituintes de *C. ladanifer* podem potencialmente ter a capacidade de quelar íons de zinco e de ferro.

Adicionalmente à análise dos metais nas folhas, fez-se a caracterização dos extratos hidroalcoólicos como pode ser visto na **tabela 3.4**.

Em ambos os extratos os metais em maior concentração são também os que estão em maior concentração nas plantas (Fe, Mn e Al), apesar de entre estes a ordem crescente de concentração ser diferente nas plantas e nos respectivos extratos. Isto justifica-se porque na preparação dos extratos não há apenas um efeito de diluição dos metais, mas ser provável que ocorra remoção parcial destes com os resíduos sólidos (seja por estarem inseridos nos tecidos das folhas; ou no caso dos que são temporariamente dissolvidos, poder haver fenômenos de adsorção ou mesmo precipitação). O zinco encontra-se em concentrações muito baixas, assim como o cobre que cujos valores de concentração se encontram abaixo do limite de detecção (<LD) o que já seria previsível visto que na análise das folhas estes eram também os metais em menor abundância.

Tabela 3.4- Caracterização do extrato hidroalcoólico de *C. ladanifer* e *E. andevalensis*

Parâmetro	Caracterização		Unidades
	<i>C. ladanifer</i>	<i>E. andevalensis</i>	
Zn	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,3	mg/L
Fe	1,37 ± 0,08	2,22 ± 0,05	
Cu	<LD*	<LD*	
Mn	4 ± 1	8,2 ± 0,6	
Al	11,2 ± 0,2	5,4 ± 0,1	
pH	5,2 ± 0,2	5,7 ± 0,2	
Fenóis Totais	433	450	mg/L

*abaixo do limite de detecção (0,648 mg/L).

3.3. Capacidade de remoção de metais pelos extratos de *C. ladanifer* e *E. andevalensis* em soluções artificiais unimetálicas

3.3.1. *Cistus ladanifer*

Antes de testar os extratos hidroalcoólicos das plantas nos efluentes reais utilizaram-se soluções unimetálicas artificiais para verificar qual a capacidade de remoção de cada metal individualmente pelo extrato de *C. ladanifer*.

Na **figura 3.1** pode ver-se as remoções de metais das soluções preparadas com 0,01M de HCl, após 1h e 48h de contacto com o extrato e respetivos controlos. As médias das concentrações dos metais e os resultados dos testes estatísticos para comparação das mesmas estão no **anexo I**.

Nas análises após 1 hora de contacto, o que se verifica é que houve remoção de quase todos os metais, no entanto a remoção foi média a elevada e significativamente diferente dos controlos (para um erro de 0,05) nos testes efetuados com os metais do grupo da platina (Pt^{2+} e Pd^{2+}) e com ouro (Au^{3+}), o que deverá estar relacionado com a maior facilidade de redução destes metais, comparativamente aos outros testados. A Pt^{2+} , o Pd^{2+} e o Au^{3+} revelaram valores de remoção de $29 \pm 4\%$, $36,05 \pm 0,05\%$ e $60 \pm 11\%$, respetivamente. Por outro lado, a remoção de ferro no teste também foi significativamente superior que no controlo, no entanto o valor de remoção foi relativamente baixo ($13 \pm 6\%$). Esta diferença poderá ser explorada na tentativa de desenvolvimento de processos baseados na utilização de extratos de plantas para recuperação destes metais de soluções multimetálicas. Uma das utilizações dos metais do grupo da platina (MGP) é em conversores catalíticos automóveis (CCA), onde, para a sua produção são consumidos cerca de 34% de Pt^{2+} e 55% de Pd^{2+} sendo por isso crucial a sua reciclagem. Estudos mostraram que a reciclagem de 2mg de CCAs gastos pode impedir o tratamento de aproximadamente 150 kg de minérios, porque os dispositivos usados têm um alto conteúdo de PGMs, com uma média de ~4g de MGPs por quilograma de material (Fornalczyk e Saternus, 2009). Assim, os resultados de remoção obtidos para a Pt e o Pd podem ser bastante promissores para recuperação destes metais de fontes secundárias.

No caso do zinco e cobre os valores foram negativos, o que poderia indicar uma transferência de metais do extrato da planta para as soluções metálicas. No entanto, no caso do zinco, a transferência foi de 5% deste metal o que corresponde a 2,2mg/L em relação à concentração inicial na mistura (44,01mg/L), valor demasiado alto tendo em conta a caracterização da **tabela 3.4** que indica que este metal está presente no extrato com valores até $0,3 \pm 0.1$ mg/L. O mesmo acontece com o Cu^{2+} que como se pode ver, as concentrações deste metal não são detetadas, isto é, não estão dentro dos limites de deteção, estando, portanto, presentes com valores muito baixos que não justificam este aumento. Portanto estes valores podem dever-se a erros de análise e não a uma possível transferência do extrato.

Após 48h os resultados não se alteraram muito, havendo apenas um pequeno aumento na remoção de Cu^{2+} , Pd^{2+} e Au^{3+} , ficando o primeiro agora com uma diferença significativamente diferente do respetivo controlo.

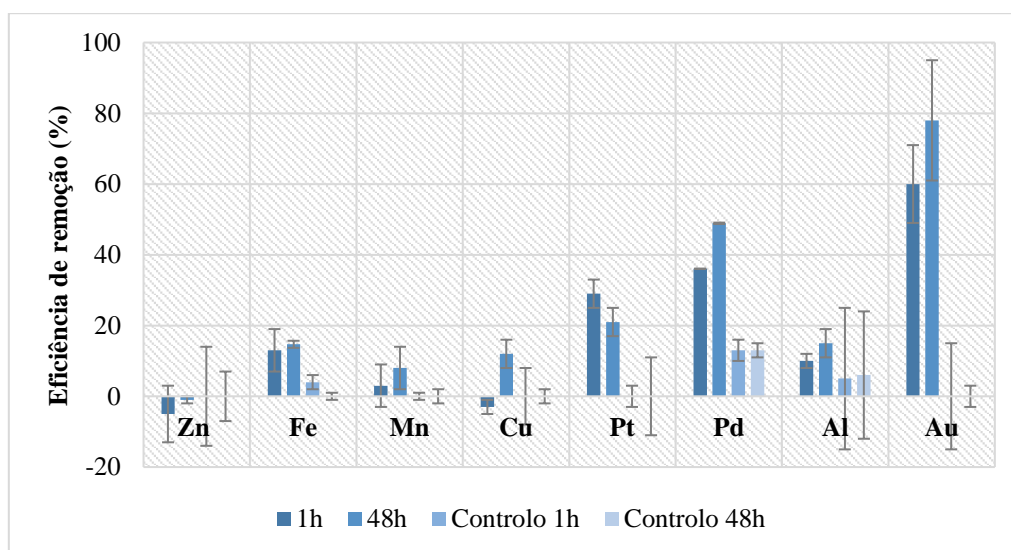


Figura 3.1- Remoção de metais pelo extrato de *C. ladanifer* em soluções artificiais unimetalicas de Zn^{2+} ($\text{Ci}= 61,940 \pm 0,009\text{mg/L}$), Fe^{3+} ($\text{Ci}=108,10 \pm 0,06\text{mg/L}$), Mn^{2+} ($\text{Ci}=99,29 \pm 0,04\text{mg/L}$), Cu^{2+} ($\text{Ci}=84,480 \pm 0,003\text{mg/L}$), Pt^{2+} ($\text{Ci}= 114,6 \pm 0,1\text{mg/L}$), Pd^{2+} ($\text{Ci}= 130,02 \pm 0,05\text{mg/L}$), Al^{3+} ($\text{Ci}= 103,98 \pm 0,79\text{mg/L}$) e Au^{3+} ($\text{Ci}=106,40 \pm 0,24\text{mg/L}$) preparadas com 0.01M HCl após 1 hora de contacto e após 48h.

Para tentar perceber se a causa das remoções observadas se deve alterações do pH, fizeram-se previsões das espécies presentes em função da variação do pH para soluções de HCl com cada um dos metais testados utilizando o programa informático Medusa-Hydra (Puigdomenech 2015). No **anexo II** está uma tabela com os valores de pH obtidos nestas simulações a partir dos quais é previsível a formação de complexos sólidos com os

metais, ou seja, em que é previsível a precipitação dos metais devido a alteração do pH. Os valores de pH medidos nas amostras (**Tabela 3.5**) são inferiores aos valores a partir dos quais é previsível haver precipitação dos metais devido a variações de pH, exceto para o Fe^{3+} em que para valores de pH maiores que 0,48 a simulação indica formação do complexo sólido $\text{Fe}(\text{OH})_{2,7}\text{Cl}_{0,3}$. Isto sugere que os valores de remoção obtidos para os metais testados, exceto o Fe^{3+} , se devem a interações com compostos do extrato. No caso do Fe^{3+} é também provável que a remoção esteja relacionada com variações de pH.

Tabela 3.5- Valores de pH das soluções iniciais unimetálicas preparadas com 0,01M HCl, e das misturas com o extrato de *C. ladanifer* e controlos após 1 hora e após 48h.

	Zn^{2+}	Fe^{3+}	Mn^{2+}	Cu^{2+}	Pt^{2+}	Pd^{2+}	Al^{3+}	Au^{3+}
pH solução metálica	0,98	0,97	0,88	0,96	0,49	0,84	0,95	0,34
pH na mistura após 1h	1,74 ± 0,02	1,57 ± 0,02	1,44 ± 0,01	1,68 ± 0,02	0,96 ± 0,00	1,43 ± 0,02	1,60 ± 0,02	0,79 ± 0,01
pH na mistura após 48h	1,80 ± 0,01	1,73 ± 0,01	1,63 ± 0,01	1,77 ± 0,02	1,18 ± 0,01	1,63 ± 0,02	1,73 ± 0,01	1,00 ± 0,02
Controlo 1h	1,47 ± 0,01	1,44 ± 0,01	1,36 ± 0,02	1,42 ± 0	0,98 ± 0,03	1,34 ± 0,01	1,50 ± 0,11	0,82 ± 0,01
Controlo 48h	1,50 ± 0,01	1,47 ± 0,02	1,37 ± 0,01	1,46 ± 0	0,95 ± 0,04	1,33 ± 0,01	1,53 ± 0,12	0,82 ± 0,01

Na **figura 3.2** estão os resultados da eficiência de remoção de metais pelo extrato de *C. ladanifer* nas soluções artificiais unimetálicas preparadas com 0.01M H_2SO_4 . As médias das concentrações dos metais e os resultados dos testes estatísticos para comparação das mesmas estão no **anexo I**.

Tal como aconteceu com as soluções preparadas com HCl, nos testes com H_2SO_4 após 1h e 48h de contacto houve remoção de Pt^{2+} e Au^{3+} relativamente elevada e significativamente diferente dos respetivos controlos, e neste caso também no metal testado adicionalmente – Ag^+ . Por outro lado, as remoções de Fe nos testes foram também significativamente superiores aos controlos e maiores que nos testes com HCl, o que será uma desvantagem em processos de recuperação destes metais a partir de lixiviados multimetálicos.

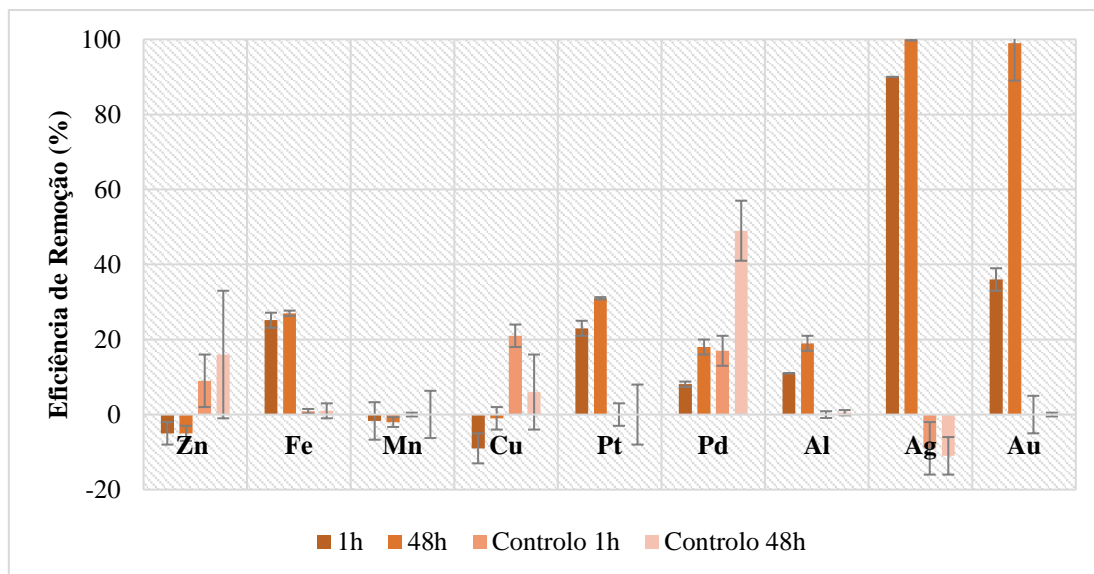


Figura 3.2- Remoção de metais pelo extrato de *C. ladanifer* em soluções artificiais unimetalicas de Zn^{2+} ($Ci= 87,88 \pm 0,01$ mg/L), Fe^{3+} ($Ci=109,85 \pm 0,03$ mg/L), Mn^{2+} ($Ci=121,80 \pm 0,02$ mg/L), Cu^{2+} ($Ci=101,24 \pm 0,06$ mg/L), Pt^{2+} ($Ci= 113,4 \pm 0,07$ mg/L), Pd^{2+} ($Ci= 101,14 \pm 0,03$ mg/L), Al^{3+} ($Ci= 98,6 \pm 0,4$ mg/L) Ag^+ ($Ci=121,5 \pm 0,3$ mg/L) e Au^{3+} ($Ci=107,7 \pm 0,2$ mg/L) preparadas com 0.01M H_2SO_4

Também neste caso, para tentar perceber se a causa das remoções observadas se deve alterações do pH, fizeram-se previsões das espécies presentes em função da variação do pH para soluções de H_2SO_4 com cada um dos metais testados utilizando o programa informático Medusa-Hydra (Puigdomenech, 2015). Os valores de pH obtidos nestas simulações a partir dos quais é previsível a formação de complexos sólidos com os metais estão no **anexo II**.

Desta vez, os valores de pH medidos, **tabela 3.6**, são inferiores aos valores a partir dos quais é previsível haver precipitação dos metais devido a este fator, exceto nas soluções com Pd^{2+} . Com este metal em solução de H_2SO_4 a simulação de espécies em função do pH indica decréscimo das concentrações de espécies solúveis e formação de complexos sólidos com o metal para valores de pH maiores que 0,00 e verifica-se que os valores de pH medidos nos testes e nos controlos são superiores a este valor. Isto justifica a elevada remoção de Pd^{2+} no controlo após 48h na experiência com este metal em H_2SO_4 , pois na solução metálica inicial o pH era 0,98 e no controlo subiu até $1,31 \pm 0,01$. Por outro lado, o facto de haver remoção significativamente maior no controlo do que no teste, apesar do pH do controlo ($1,28 \pm 0,01$) ser um pouco inferior ao pH do teste ($1,57 \pm 0,01$), deve-se provavelmente à formação de complexos do metal com compostos orgânicos que se mantêm solúveis no teste com extrato de planta.

Tabela 3.6- Valores de pH das soluções iniciais unimetálicas preparadas com 0.01M H₂SO₄, e das misturas com o extrato de *C. ladanifer* e controlos após 1 hora e após 48h.

	Zn ²⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Pt ²⁺	Pd ²⁺	Al ³⁺	Ag ⁺	Au ³⁺
pH solução metálica	1,07	1,06	0,94	1,06	0,63	0,98	1,04	0,91	0,51
pH na mistura após 1h	1,58 ± 0,02	1,56 ± 0,01	1,46 ± 0,03	1,57 ± 0,01	1,05 ± 0,02	1,50 ± 0,02	1,553 ± 0,006	1,38 ± 0,02	0,87 ± 0,03
pH na mistura após 48h	1,43 ± 0,02	1,61 ± 0,01	1,54 ± 0,04	1,63 ± 0,01	1,11 ± 0,01	1,57 ± 0,01	1,593 ± 0,006	1,43 ± 0,02	0,97 ± 0,01
Controlo 1h	1,34 ± 0,01	1,40 ± 0,01	1,32 ± 0	1,39 ± 0,01	0,97 ± 0,04	1,31 ± 0,01	1,37 ± 0,01	1,17 ± 0,01	0,81 ± 0
Controlo 48h	1,35 ± 0,01	1,37 ± 0,01	1,30 ± 0,01	1,38 ± 0,01	0,93 ± 0,02	1,28 ± 0,01	1,36 ± 0,01	1,16 ± 0,01	0,81 ± 0,01

3.3.2. *E. andevalensis*

Os resultados de remoção de metais obtidos da mistura do extrato de *E. andevalensis* com as soluções artificiais unimetálicas são semelhantes aos obtidos com o extrato de *C. ladanifer*.

Na **figura 3.3** estão os resultados obtidos para as soluções preparadas com 0,01M HCl. As médias das concentrações dos metais e os resultados dos testes estatísticos para comparação das mesmas estão no **anexo I**. Como se pode ver, após 1 hora de contacto, houve remoção de todos os metais, no entanto a remoção apenas foi significativamente superior ao controlo nos testes com ferro e com os metais do grupo da platina. As remoções de Fe³⁺ e Pt²⁺ foram relativamente baixas (26±12% e 19±1%) e as remoções de Pd²⁺ e de Au³⁺ foram satisfatórias (81 ± 4% e 45±4%).

Após 48h não houve grandes alterações a não ser um aumento bastante significativo da remoção de Au³⁺, que passou para 98 ± 4%.

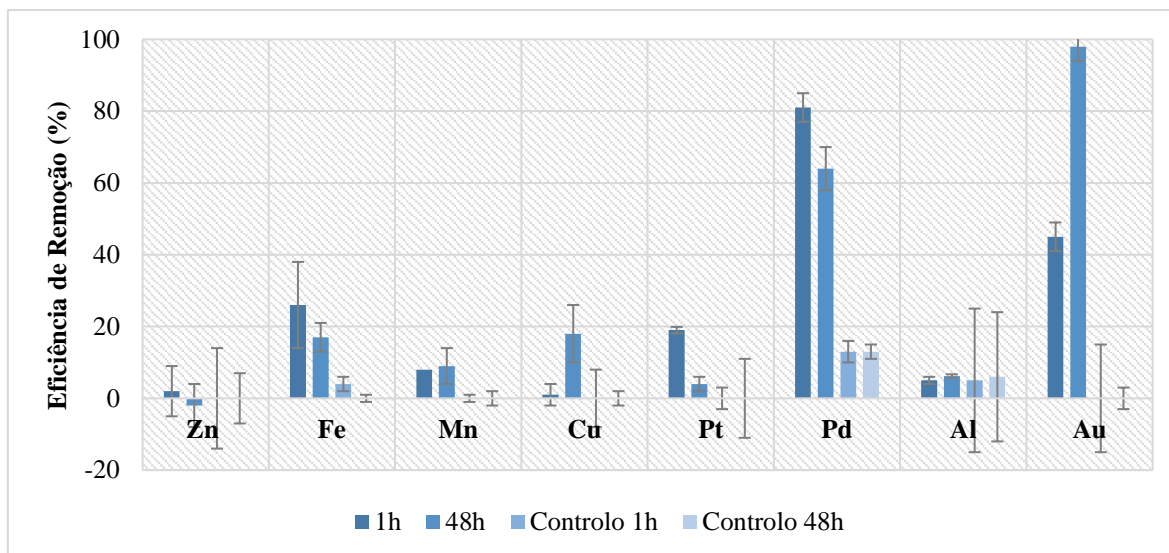


Figura 3.3- Remoção de metais pelo extrato de *E. andevalensis* em soluções artificiais unimetálicas de Zn^{2+} ($C_i=61,940 \pm 0,009mg/L$), Fe^{3+} ($C_i=108,10 \pm 0,06mg/L$), Mn^{2+} ($C_i=99,29 \pm 0,04mg/L$), Cu^{2+} ($C_i=84,480 \pm 0,003mg/L$), Pt^{2+} ($C_i=114,6 \pm 0,1mg/L$), Pd^{2+} ($C_i=130,02 \pm 0,05mg/L$), Al^{3+} ($C_i=103,98 \pm 0,79mg/L$) e Au^{3+} ($C_i=106,40 \pm 0,24mg/L$) preparadas com 0.01M HCl após 1h e 48h de contacto.

Em relação ao pH, os valores medidos (**tabela 3.7**) são todos inferiores aos valores a partir dos quais é previsível haver precipitação dos metais devido este fator, exceto para o Fe^{3+} (**anexo II**). Tal como referido na secção anterior, no estudo com *C. ladanifer*, isto sugere que a remoção dos outros metais está provavelmente relacionada apenas com interações com compostos da planta, enquanto no caso do Fe^{3+} a remoção poderá estar relacionada também com a variação do pH.

Tabela 3.7- Valores de pH das soluções iniciais unimetálicas preparadas com 0.01M HCl, e das misturas com o extrato de *E. andevalensis* e controlos após 1 hora e após 48h.

	Zn^{2+}	Fe^{3+}	Mn^{2+}	Cu^{2+}	Pt^{2+}	Pd^{2+}	Al^{3+}	Au^{3+}
pH solução metálica	0,98	0,97	0,88	0,96	0,49	0,84	0,95	0,34
pH na mistura após 1h	1,74 ± 0,02	1,66 ± 0,01	1,55 ± 0,01	1,69 ± 0,01	1,11 ± 0,01	1,56 ± 0,03	1,66 ± 0,02	0,95 ± 0,01
pH na mistura após 48h	1,74 ± 0,03	1,65 ± 0,01	1,55 ± 0,01	1,67 ± 0	1,11 ± 0,02	1,56 ± 0,02	1,64 ± 0	0,96 ± 0,01
Controlo 1h	1,47 ± 0,01	1,44 ± 0,01	1,36 ± 0,02	1,42 ± 0	0,98 ± 0,03	1,34 ± 0,01	1,50 ± 0,11	0,82 ± 0,01
Controlo 48h	1,50 ± 0,01	1,47 ± 0,02	1,37 ± 0,01	1,46 ± 0	0,95 ± 0,04	1,33 ± 0,01	1,53 ± 0,12	0,82 ± 0,01

Para as soluções unimetais preparadas com H₂SO₄ em mistura com o extrato de *E. andevalensis* os resultados (figura 3.4, anexo I) mostram que apenas houve remoção significativamente maior que nos controlos para a Pt²⁺, Ag⁺ e Au³⁺, com valores de 42 ± 3%, 85 ± 5% e 93 ± 7% após 1h, e valores de 40 ± 1, 91 ± 2% e 99 ± 2% após 48h, respetivamente.

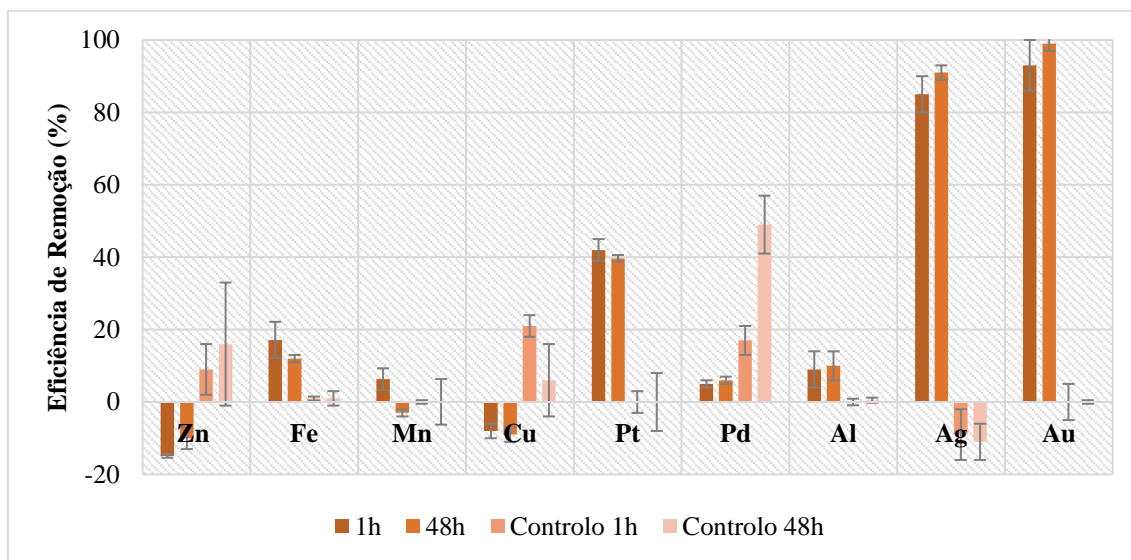


Figura 3.4- Remoção de metais pelo extrato de *E. andevalensis* em soluções artificiais unimetais Zn²⁺ (Ci= 87,88 ± 0,01 mg/L), Fe³⁺ (Ci=109,85 ± 0,03 mg/L), Mn²⁺ (Ci=121,80 ± 0,02 mg/L), Cu²⁺ (Ci=101,24 ± 0,06 mg/L), Pt²⁺ (Ci= 113,4 ± 0,07 mg/L), Pd²⁺ (Ci= 101,14 ± 0,03 mg/L), Al³⁺(Ci= 98,6 ± 0,4 mg/L) Ag⁺ (Ci=121,5 ± 0,3 mg/L) e Au³⁺ (Ci=107,7 ±0,2mg/L) preparadas com 0.01M H₂SO₄, após 1h e 48h de tempo de contacto.

Na **tabela 3.8**, estão os valores de pH para cada amostra. Os valores são inferiores aos valores a partir dos quais é previsível haver precipitação dos metais devido a este fator, exceto nas soluções com Pd em que os valores de pH variam entre 0,98 e 1,56 mas a simulação de espécies em função do pH indica formação de complexos sólidos com o metal para valores de pH maiores que 0,00. Isto justifica a elevada remoção de Pd no controlo após 48h, tal como referido acima na secção dos testes com extrato de *C. ladanifer*.

Tabela 3.8- Valores de pH das soluções iniciais unimetálicas preparadas com 0.01M H₂SO₄, e das misturas com o extrato de *E. andevalensis* após 1 hora e após 48h.

	Zn ²⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Pt ²⁺	Pd ²⁺	Al ³⁺	Ag ⁺	Au ³⁺
pH solução metálica	1,07	1,06	0,94	1,06	0,63	0,98	1,04	0,91	0,51
pH na mistura após 1h	1,52 ± 0,01	1,50 ± 0,01	1,44 ± 0	1,51 ± 002	1,01 ± 0,02	1,46 ± 0,01	1,51 ± 0,01	1,30 ± 0,01	0,85 ± 0,02
pH na mistura após 48h	1,61 ± 0,01	1,61 ± 0,01	1,54 ± 0,01	1,62 ± 0	1,08 ± 0,03	1,56 ± 0,03	1,60 ± 0,02	1,41 ± 0,01	0,97 ± 0,02
Controlo 1h	1,34 ± 0,01	1,40 ± 0,01	1,32 ± 0	1,39 ± 0,01	0,97 ± 0,04	1,31 ± 0,01	1,37 ± 0,01	1,17 ± 0,01	0,81 ± 0
Controlo 48h	1,35 ± 0,01	1,37 ± 0,01	1,30 ± 0,01	1,38 ± 0,01	0,93 ± 0,02	1,28 ± 0,01	1,36 ± 0,01	1,16 ± 0,01	0,81 ± 0,01

3.4. Capacidade de remoção de metais pelos extratos de *Cistus* e *Erica* em efluentes contaminados

3.4.1. Vertido do zinco

A **figura 3.5** mostra os resultados da mistura dos extratos hidroalcoólicos de *E. andevalensis* e *C. ladanifer* com o efluente da zincagem na proporção de 1:1 (v/v), para remoção de zinco e ferro.

Com o extrato de *E. andevalensis*, houve remoção de Zn e Fe, no entanto com percentagens baixas ($22 \pm 2\%$ de Zn e $12,9 \pm 0,7\%$ de Fe). No caso do *C. ladanifer* apenas houve remoção de Fe ($20,7 \pm 0,5\%$) do efluente e para o Zn obteve-se um valor negativo ($-3,5 \pm 0,5\%$), o que indica um aumento deste metal. No entanto, tal como já foi referido em secções anteriores, a concentração de zinco no extrato é tão baixa que não justifica este aumento, portanto esta remoção negativa poderá ser devido a presença no extrato de compostos interferentes na análise de zinco por absorção atómica em chama ou erros de análise (por exemplo nas diluições).

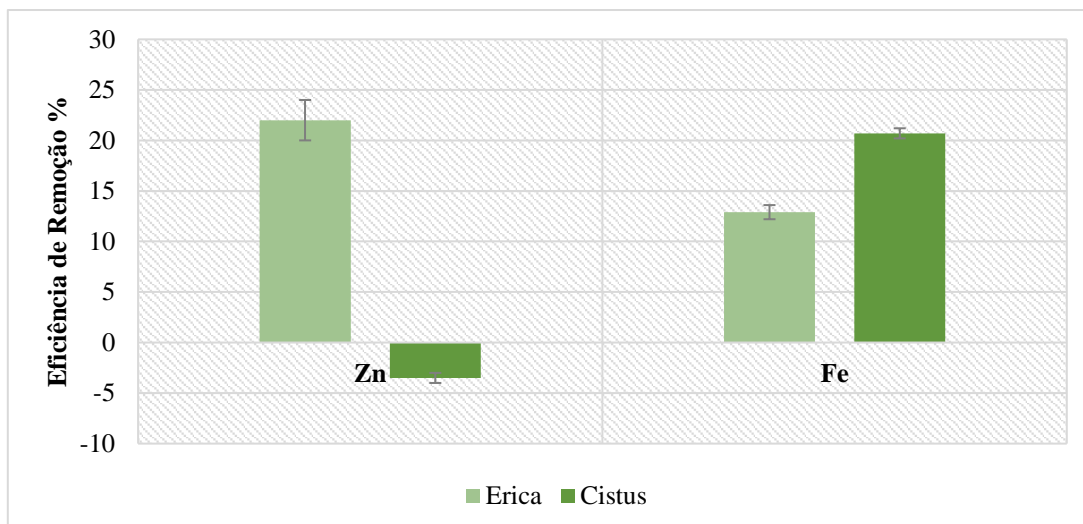


Figura 3.5- Remoção dos metais Zn e Fe do efluente da zincagem pelos extratos de *E. andevalensis* e *C. ladanifer*

Na **tabela 3.9** estão os valores de pH obtidos na mistura dos extratos das plantas com o vertido do zincado, após 1 hora de contacto. O que podemos ver com estes resultados é que no caso do Zn^{2+} o pH das misturas é muito inferior ao valor (7,37 (**anexo II**)) a partir do qual é previsível precipitação deste metal por aumento de alcalinidade, estimado na simulações teórica para soluções em HCl, como é o caso do vertido do zincado; enquanto no caso do Fe^{3+} o pH das misturas é superior ao valor (0,48 (**anexo II**)) em que a simulação indica que se forma o complexo sólido $Fe(OH)_{2,7}Cl_{0,3}$. No entanto, no vertido de zincagem o pH (2.1) é já bastante superior a 0,48 e os metais estão estáveis nas concentrações medidas na caracterização inicial, pelo que as remoções observadas quer de Zn^{2+} quer de Fe^{3+} deverão estar relacionadas com interações com compostos das plantas e não devido à variação de pH.

Tabela 3.9- Valores de pH nas misturas do extrato com o vertido do zincado na proporção 1:1 (v/v) após 1 hora.

Extrato	pH mistura 1:1 (v/v)
<i>E. andevalensis</i>	3,25 ± 0,05
<i>C. ladanifer</i>	2,86 ± 0,01

3.4.2. AMD

Na **figura 3.6** estão os resultados obtidos dos testes da mistura dos extratos das plantas com a AMD para cada metal analisado e respectivas eficiências de remoção.

Com o extrato de *C. ladanifer* (**Figura 3.6**) na AMD os resultados foram bastante positivos uma vez que houve remoção em todos os metais. A percentagem de remoção mais alta foi a do Al, com $63 \pm 14\%$. Para o Zn, Fe, Cu e Mn a eficiência de remoção também foi satisfatória, com valores de $51 \pm 1\%$, $52 \pm 2\%$, $43 \pm 1\%$ e $36 \pm 1\%$ respetivamente.

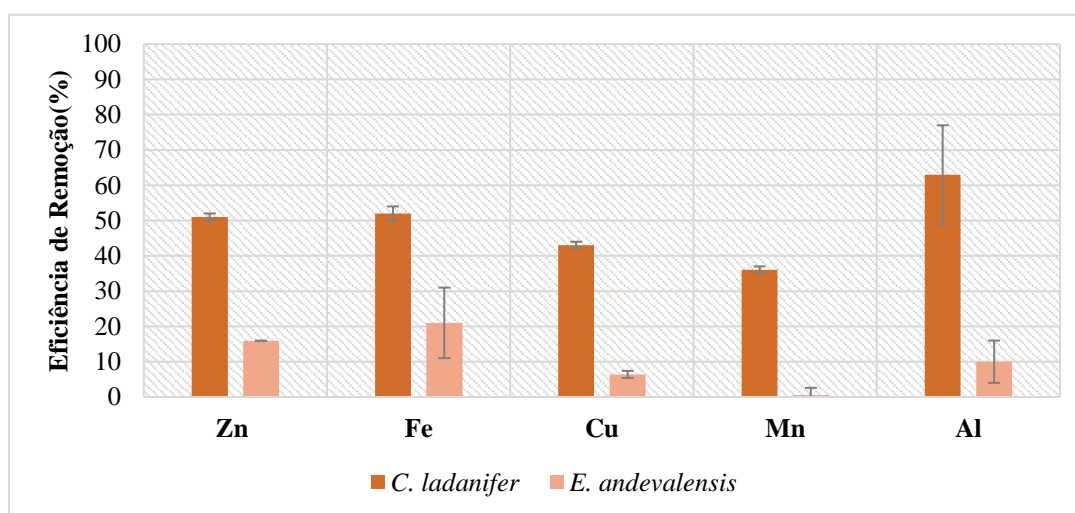


Figura 3.6- Eficiência de remoção de metais da AMD por mistura com extrato hidroalcoólico de *C. ladanifer* na proporção 1:1 (v/v) e reação durante 1 hora.

Tendo em conta que as quantidades iniciais de metais na AMD de Fe, Zn, Cu e Al são muito elevadas (**Tabela 3.1**), estes valores de remoção obtidos, apesar de não estarem próximos da remoção total, correspondem a altas quantidades de metal removidas. Se considerarmos o caso do Fe que está presente numa concentração mais alta neste efluente, 55240 ± 3670 mg/L, a *C. ladanifer* conseguiu remover 14362,4 mg/L, que corresponde a 52% da concentração inicial na AMD numa proporção de 1:1(v/v). Fazendo estes cálculos para os restantes metais, a *C. ladanifer* removeu 660,2 mg/L de Zn, 989,6 mg/L de Cu, 1959,6 de Al. No caso do Mn, e tendo em conta estes últimos resultados seria de esperar uma remoção bastante mais eficiente uma vez que a concentração inicial, comparativamente aos restantes metais é baixa, de apenas $123,9 \pm 0,2$ mg/L, no entanto, o extrato de *C. ladanifer* apenas removeu 22,3 mg/L de Mn.

Com o extrato de *E. andevalensis*, cujos resultados se encontram na **figura 3.6**, houve alguma remoção de todos os metais, apesar de ser em percentagens baixas. Como já foi referido anteriormente, a AMD utilizada neste estudo é bastante concentrada pelo que os valores de remoção observados para o Zn e Cu correspondem a altas concentrações de metal removido do efluente, o mesmo aconteceu para o Fe e Al, no entanto nestes dois metais o desvio padrão obtido foi muito alto o que indica que houve discrepâncias nas análises que podem provir de erros ou interferentes presentes na amostra. No caso do Mn este foi o metal para o qual se obteve menor remoção ($0,6\pm 2\%$), sendo este também o metal em menor abundância na AMD. Outro motivo para esta remoção quase nula pode estar relacionado com o facto de esta planta acumular Mn nas suas folhas e de estar num ponto de “saturação” em que não existem mais compostos disponíveis para se ligar ao metal fazendo com que este precipite.

Estes resultados mostram que o extrato de folhas de *C. ladanifer* tem melhor capacidade remover metais deste tipo de AMD muito concentrada do que o extrato de folhas de *E. andevalensis*, com o qual se obteve cerca de metade da remoção. No entanto, os resultados obtidos evidenciam que extratos de ambas as plantas poderão ser úteis para descontaminação deste tipo de efluentes, deixando a ideia de que extratos de muitas outras plantas também poderão ter esta capacidade. Por outro lado, para isolar metais com fim à sua recuperação, nenhuma destas plantas parece ser uma boa opção visto que não se verificou especificidade para nenhum dos metais, havendo remoção de todos em simultâneo.

Relativamente ao pH das misturas dos extratos com AMD, os valores medidos (**Tabela 11**) são inferiores aos valores a partir dos quais os metais analisados neste trabalho podem começar a formar complexos sólidos segundo as simulações teóricas para os principais metais da AMD, nas concentrações medidas na caracterização inicial, assim como para o SO_4^{2-} e o Cl^- (**anexo II**). Isto permite sugerir que também neste caso as remoções poderão estar relacionadas com interações com compostos dos extratos.

Tabela 3.10- Valores de pH nas misturas do extrato com a AMD na proporção 1:1 (v/v) após 1 hora.

Extrato	pH mistura 1:1(v/v)
<i>E. andevalensis</i>	$1,47 \pm 0,03$
<i>C. ladanifer</i>	$1,49 \pm 0,02$

3.5. Extração por solvente (ES)

3.5.1. ES com extrato de *C. ladanifer* preparado com Shell GTL e Octanol (Teste 1) e apenas com Shell GTL (Teste 2)

Na **figura 8** pode ver-se os resultados dos testes de ES para ambos os extratos, um preparado com 50% (v/v) Shell GTL e 50% Octanol e outro apenas com Shell GTL, em termos de eficiência na remoção de zinco e ferro.

Em ambos os casos houve extração de ferro, no entanto com percentagem muito baixa, e por outro lado foi observada uma eficiência de extração negativa no zinco ($-3 \pm 1\%$ no teste 1 e $-4 \pm 1\%$ no teste 2) que indica que houve transferência deste metal do extrato da planta para o efluente da zincagem.

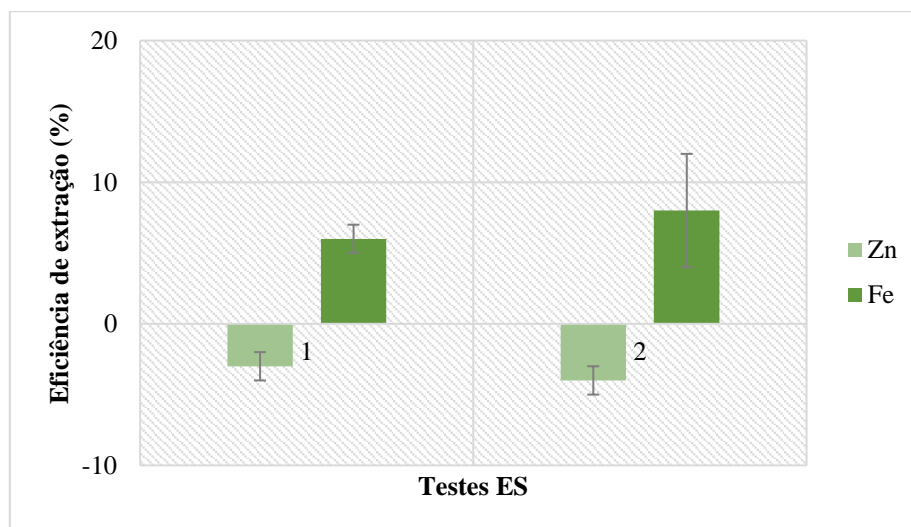


Figura 3.7- Eficiência de extração de zinco e ferro na extração de solvente a partir do efluente da zincagem usando extratos de *C. ladanifer* preparados com Shell GTL e Octanol (Teste 1) e com apenas Shell GTL (Teste 2) como fases orgânicas.

Estes resultados sugerem que as folhas de *C. ladanifer* utilizadas têm zinco acumulado. Assumindo que todos os iões de zinco dos extratos foram transferidos para o efluente da zincagem, podem estimar-se as concentrações deste metal nas folhas utilizadas nos testes 1 e 2 com a Eq. 2 como sendo 138 ± 52 mg/Kg folhas secas e 164 ± 57 mg/Kg folhas secas respetivamente.

$$metal\ nas\ folhas\left(\frac{mg}{kg_{folhas}}\right) = \frac{Cf \times V_{vert.zn} - Ci \times V_{vert.zn}}{m_{folhas}} \quad (2)$$

Onde Ci e Cf são as concentrações iniciais e finais dos íons metálicos (em mg/L), $V_{vert.zn}$ é o volume de efluente da zincagem utilizado na experiência (em L); m_{folhas} é a massa das folhas da planta usada (em Kg).

Os resultados obtidos estão em concordância com os de Santos et al. (2012) e Durães et al (2015). Santos et al. (2012) reportou que as folhas de *C. ladanifer* na mina de São Domingos podem acumular íons de zinco até 147,88 mg/Kg peso seco. No entanto, na análise de metais para a caracterização das folhas (**Tabela 3.3**) o valor de zinco encontrado nas folhas de *C. ladanifer* foi cerca de 1/10 do valor estimado aqui com base na eventual transferência de zinco do extrato para o efluente da zincagem, evidenciando alguma margem de erro experimental nas análises.

3.5.2. ES com acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos de *C. ladanifer* (Testes 3 a 7)

Os resultados dos testes de ES com acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos segundo diferentes métodos (**Tabela 2.4** – materiais e métodos) revelaram diferentes níveis de eficiência de extração de zinco e ferro, e em nenhum caso houve evidências de transferência destes metais dos extratos de planta para o efluente da zincagem (**Figura 3.8**).

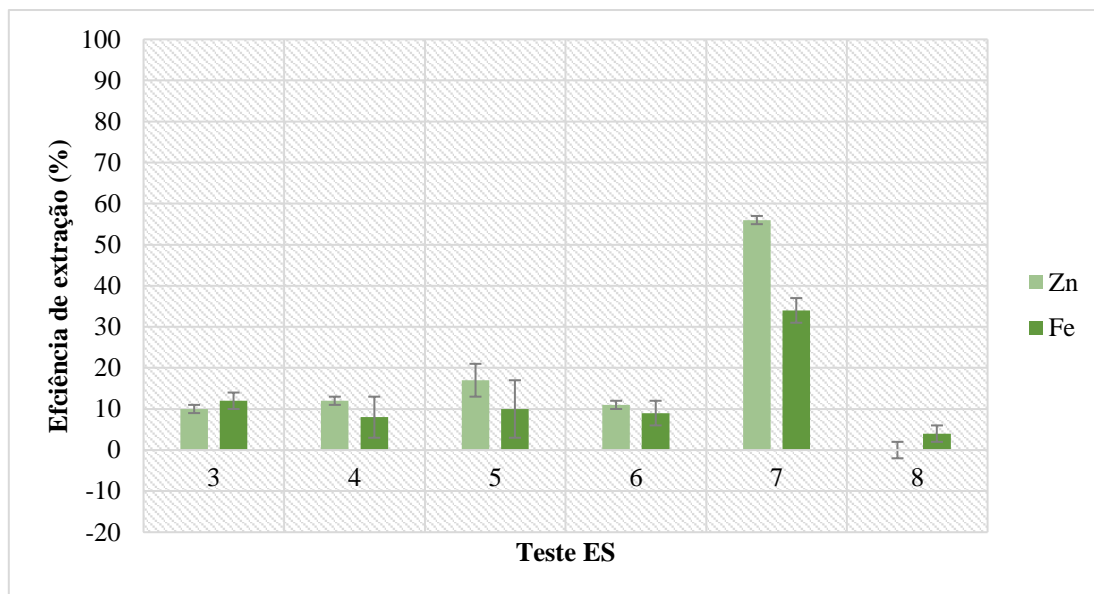


Figura 3.8- Eficiência da extração de zinco e ferro do efluente da zincagem usando acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos extraídos de *C. ladanifer* com acetona segundo diferentes métodos (Tabela 2.4 nos materiais e métodos).

As primeiras 3 tentativas de ES de zinco e ferro com acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos extraídos com 50% (v/v) de acetona em água tiveram pouco sucesso, no entanto foram importantes para confirmar a utilidade de usar água acidificada para permitir que sejam extraídos em simultâneo os compostos fenólicos livres e ligados. Quando foi usada 50% de acetona em água acidificada (1.2.M HCl) para extrair os compostos fenólicos das folhas secas (Teste 5) a concentração de fenóis totais atingida no acetato de etilo teve um valor próximo da concentração obtida quando apenas fenóis livres foram extraídos usando 50% (v/v) de acetona em água (teste 3) somada com a concentração obtida quando os fenóis ligados foram extraídos do resíduo sólido da planta após a extração dos fenóis livres (Teste 4) (**Tabela 3.11**). Os testes seguintes (6 e 7) mostraram que o rendimento em compostos fenólicos quando se usa 65% de acetona não é melhor que quando se usa 50 %, mas que aumenta drasticamente quando se usa 80%, tal como aumenta a eficiência da ES de ferro e zinco quando se utiliza o acetato de etilo enriquecido a partir do extrato preparado com 80% de acetona (**Figura 3.8**).

Tabela 3.11-Concentrações dos fenóis totais obtidas no etil acetato com diferentes soluções de acetona/água usadas para extrair compostos de *C. ladanifer* para os testes de extração por solvente (ES) no efluente da zincagem. S/L significa extração sólido/líquido e L/L extração líquido/líquido

Teste ES	Descrição resumida da preparação das fases orgânicas para a ES	[Fenóis totais] no acetato de etilo (mg/L)
3	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 50% (v/v) acetona / água destilada, seguido de evaporação da acetona. L/L: Extrato sem acetona / Acetato de etilo 1:1 (v/v) transferência dos compostos das plantas	39
4	S/L: 10% (v/v) resíduo sólido do teste 3 em 50% (v/v) acetona / água acidificada (1.2M HCl) L/L: 50% (v/v) Extrato sem acetona / Acetato de etilo para transferência dos compostos das plantas	31
5	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 50% (v/v) Acetona / água acidificada (1.2M HCl) L/L: 50% (v/v) Extrato sem acetona Acetato de etilo para transferência dos compostos das plantas.	63
6	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 65% (v/v) Acetona / água acidificada (1.2M HCl) L/L: 50% (v/v) Extrato sem acetona / Acetato de etilo para transferência dos compostos das plantas.	44
7	S/L: 10% (w/v) folhas secas moídas de <i>C. ladanifer</i> em 80% (v/v) Acetona / água acidificada (1.2M HCl) L/L: 50% (v/v) Extrato sem acetona / Acetato de etilo para transferência dos compostos das plantas.	610
8	Os controles das extrações por solvente foram realizados com Acetato de etilo puro.	Não detetado

Em resumo, em relação à ES de zinco e ferro do efluente de zincagem utilizando acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos extraídos de *C. ladanifer*, os resultados sugerem uma relação direta entre a concentração de fenóis totais alcançada no acetato de etilo e a eficiência de extração destes metais (**Fig. 3.8** e **Tabela 3.11**). A confirmar isto, regressões lineares entre as eficiências de extração de zinco e ferro e as concentrações de fenóis totais resultaram em coeficientes de regressão de $R^2 = 0,96$ e $R^2 = 0,97$, respetivamente. Isto não é surpreendente, uma vez é sabido que os compostos fenólicos de plantas desempenham um papel importante como agentes redutores e têm capacidade de quelar metais (*ex.* Rossini-oliva et al.,2018).

3.5.3. ES com outros solventes orgânicos enriquecidos com compostos fenólicos de *C. ladanifer*

Na figura seguinte pode ver-se a eficiência da extração de zinco e ferro (**Figura 3.9**) do efluente da zincagem usando diferentes solventes orgânicos enriquecidos com os compostos de *C. ladanifer*.

O acetato de etilo (EA), que já tinha sido testado anteriormente, foi aqui testado novamente para servir de referência. A eficiência de extração de zinco neste solvente foi a mais alta ($22 \pm 0,7\%$) e quase o dobro da extração obtida com os outros solventes, no entanto este valor foi muito mais baixo do que o esperado visto que anteriormente se obteve uma extração de zinco de $56\% \pm 1$ (**Figura 3.8**). Em relação aos restantes solventes orgânicos, a eficiência de extração mais alta de zinco após 1h foi de $12 \pm 1\%$ com octanol (oct). Ao utilizar o acetato de butilo (BA) obteve-se a eficiência de extração mais baixa com $10 \pm 2\%$ de remoção de Zn, muito semelhante ao teste com butirato de etilo com $10,9 \pm 0,4\%$ de remoção.

Em relação à extração de Fe (**Figura 3.9**), o acetato de etilo continuou a ser o solvente com um valor de extração mais alto, mas apenas de $16,2 \pm 0,5\%$. Comparativamente à experiência anterior (**Figura 3.8**), este valor está também abaixo do esperado visto que antes a extração de Fe^{3+} nas mesmas condições foi de $34 \pm 3\%$.

Pode também observar-se que a eficiência de remoção de Zn foi superior à remoção de Fe o que nos indica que os compostos de *C. ladanifer* têm maior afinidade de ligação com o Zn comparativamente à ligação ao Fe.

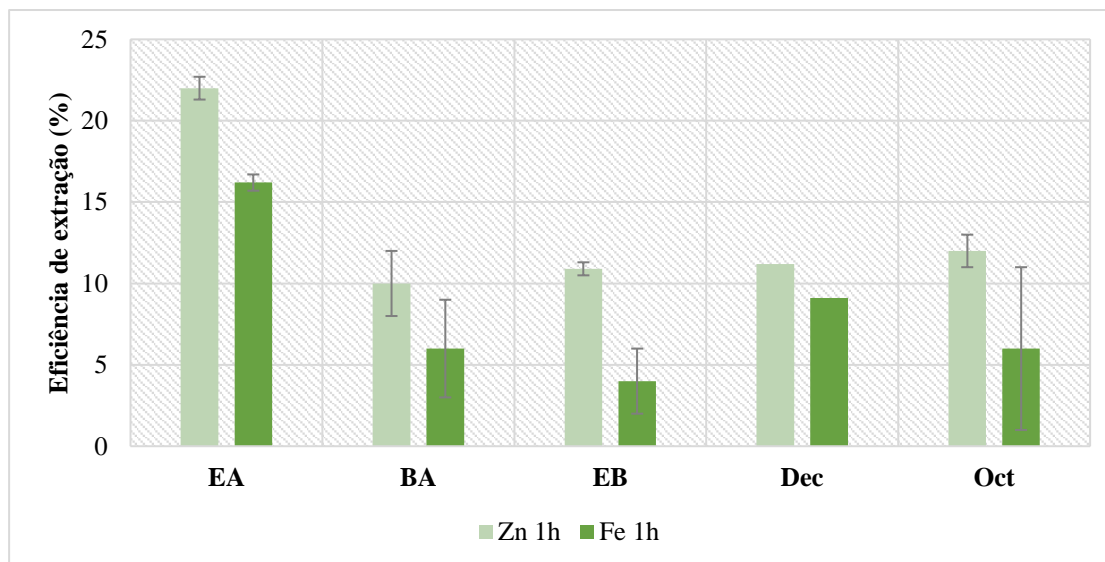


Figura 3.9- Eficiência da extração de zinco e ferro do efluente da zincagem usando os solventes orgânicos acetato de etilo (EA), butirato de etilo (EB), acetato de butilo (BA), decanol (Dec) e octanol (Oct) enriquecidos compostos de *C. ladanifer*.

Em relação aos fenóis totais na fase orgânica, (**Tabela 3.12**) há evidência de existir uma correlação entre a concentração de fenóis e a eficiência de extração, exceto nos testes com decanol e octanol, pois as concentrações mais altas de fenóis na fase orgânica foram nestes dois solventes, no entanto as eficiências de extração de zinco e ferro foram as mais baixas. Por outro lado, parece existir uma relação entre a quantidade de fenóis na fase aquosa e a extração de zinco: a ordem de extração de zinco foi EA>Oct>Dec>EB>BA e a concentração de fenóis segue a ordem EA>Oct>Dec>BA>EB. Apenas o butirato de etilo(EB) e acetato de butilo não correspondem, o que pode estar relacionado ao facto de estes apresentam valores muito próximos e muito baixos tanto de percentagem de extração como de quantidade de fenóis.


Tabela 3.12- Concentrações de fenóis totais nas fases orgânicas enriquecidas com os compostos de *C. ladanifer*, e nas fases aquosas após 1 dia. (acetato de etilo (EA), butirato de etilo (EB), acetato de butilo (BA), decanol (Dec) e octanol (Oct))

Amostra	Fenóis Totais (mg/L)				
	EA	BA	EB	Dec	Oct
Fase orgânica	640	410	408	821	1009
Fase Aquosa	118	23,9	18	47,9	72,2

Existem alguns fatores que podem afetar a extração dos compostos fenólicos tais como a própria natureza química destes compostos, e o facto de estes formarem

complexos com carboidratos, proteínas e outros componentes da planta podendo torná-los insolúveis. A solubilidade dos fenóis é também afetada pela polaridade dos solventes usados (Naczki e Shahidi, 2006) pelo que os solventes polares são os mais frequentemente usados para recuperação de polifenóis de matrizes de plantas (Diem et al., 2013). Diem et al., 2013 mostrou que a extração aumenta com o aumento da polaridade do solvente usado na extração. A **tabela 3.13** mostra os valores de solubilidade em água organizados do mais para o menos solúvel, isto é, do mais polar para o menos polar e de facto o EA que é o mais solúvel foi o que obteve melhor eficiência de extração de zinco e ferro, no entanto, em termos de extração de fenóis do extrato da planta para a fase orgânica foi o octanol que atingiu a concentração mais alta. Por outro lado, na fase aquosa o EA foi o que obteve valores de fenóis totais mais altos.

Tabela 3.13- Características de solubilidade, densidade e polaridade dos solventes orgânicos utilizados na extração dos metais.

Solvente Orgânico	Solubilidade em H ₂ O (g/l)	Polaridade
EA	85,3 ⁽¹⁾	
BA	5,3 ⁽¹⁾	
Oct	0,3 ⁽²⁾	
EB	0,21 ⁽¹⁾	
Dec	0,02 ⁽¹⁾	

(1): <http://www.merckmillipore.com>; (2) <https://pt.vwr.com/store/product/731463/1-octanol-para-sintese-sigma-aldrich>

3.5.4. ES com outros solventes orgânicos enriquecidos com compostos fenólicos de *E. andevalensis*

A **figura 3.10** mostra a eficiência de extração de ferro e zinco com diferentes solventes orgânicos enriquecidos com compostos da planta *E. andevalensis*. O que primeiro se pode observar é que a remoção de ferro foi superior em todos os solventes comparativamente à de zinco. Os melhores resultados de eficiência de remoção aconteceram quando se usou o EA como solvente orgânico, obtendo-se uma remoção de $30 \pm 1\%$ de Fe e apenas $12 \pm 3\%$ de Zn. As restantes eficiências obtidas foram de $24 \pm 2\%$, $17,5 \pm 0,3\%$, $20,8 \pm 0,1\%$ e $16 \pm 1\%$ de remoção de Fe com os solventes BA, EB, Dec e Oct, respetivamente. Já no caso do zinco os valores foram muito baixos com apenas remoção de $4 \pm 2\%$, $8 \pm 1\%$, $5 \pm 2\%$ e $2 \pm 3\%$ com BA, EB, Dec e Oct, respetivamente.

Pelos resultados obtidos pode também verificar-se que, uma vez que os resultados de eficiência de remoção de ferro foram mais altos, os compostos de *E. andevalensis* têm uma maior capacidade de ligar Fe do que o Zn.

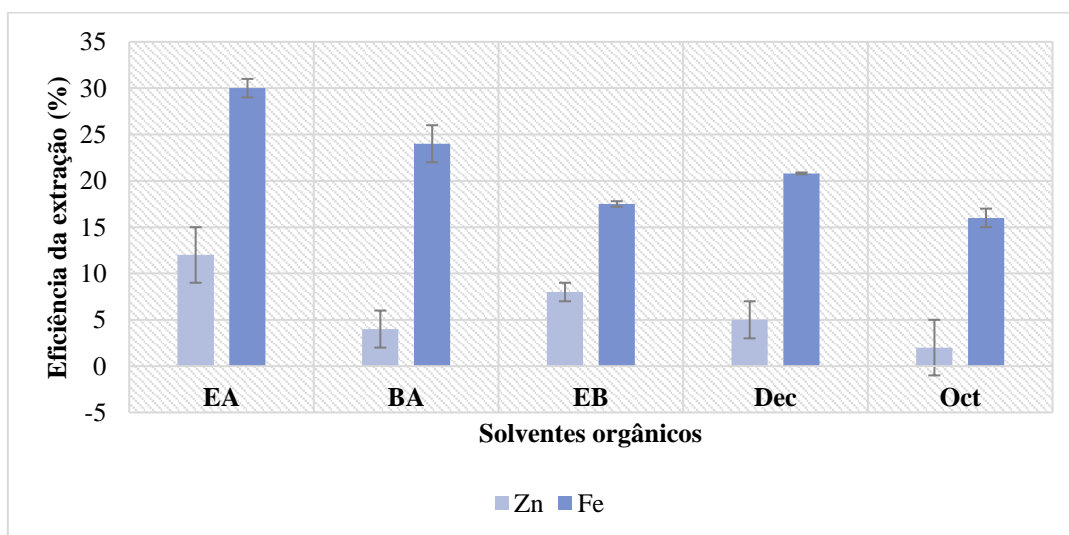


Figura 3.10- Eficiência da extração de zinco e ferro do efluente da zincagem usando os solventes orgânicos acetato de etilo (EA), butirato de etilo (EB), acetato de butilo (BA), decanol (Dec) e octanol (Oct) enriquecidos com compostos de *E. andevalensis*.

A análise dos fenóis totais na fase orgânica mostrou que os valores mais elevados foram no octanol e no EA, enquanto o valor mais baixo foi no EB (**tabela 3.14**). De facto, parece haver uma tendência entre a quantidade de fenóis e a eficiência de remoção dos metais, exceto nos casos do decanol e octanol em que seriam esperados valores mais elevados de extração dos metais.

Tabela 3.14- Concentrações de fenóis totais nas fases orgânicas enriquecidas com os compostos de *E. andevalensis*.

Amostra	Fenóis Totais (mg/L)				
	EA	BA	EB	Dec	Oct
Fase orgânica	848	571	386	678	879

Como já foi dito anteriormente existem estudos que sugerem que a solubilidade dos solventes afeta a eficiência de extração dos fenóis, o que, neste caso, vai consequentemente afetar a extração dos metais do vertido do zincado. Fazendo uma comparação dos valores de solubilidade da **tabela 3.13** com os valores de fenóis totais obtidos na fase orgânica (**Tabela 3.14**) apenas se verifica que o EA sendo o mais solúvel foi um dos dois solventes em que se obteve maior concentração de fenóis.

4. Conclusões

Existem várias técnicas para o tratamento de metais pesados a partir de águas residuais, no entanto todos produzem grandes resíduos sólidos secundários, têm altos custos de capital, de químicos e operacionais. Com a maior consciencialização que existe atualmente para os problemas ambientais que conseqüentemente leva a restrições legais impostas à descarga de efluentes, é essencial o estudo de novas tecnologias alternativas eficazes e sustentáveis para o tratamento dos efluentes, e se possível com possibilidade de recuperação de metais, que foi o que se pretendeu testar neste trabalho utilizando extratos de plantas.

Numa abordagem inicial para testar a capacidade dos extratos hidroalcoólicos de *E. andevalensis* e *C. ladanifer* em precipitar metais de interesse, e outros que muitas vezes estão juntos aos de interesse, em soluções unimetálicas preparadas com HCl e H₂SO₄, concluiu-se que estes extratos precipitam os metais do grupo da platina e o ouro nos dois tipos de matrizes, assim como a prata em H₂SO₄, e o mesmo acontece com o ferro mas com valores de remoção inferiores. Assim em estudos futuros é possível tentar explorar estas diferenças para o desenvolvimento de processos para isolar os metais mais valiosos como a Pt, Pd, Ag e Au com vista à sua recuperação de soluções multimetálicas.

Noutra parte do trabalho, em que o objetivo foi testar a capacidade destes extratos para recuperação ou remoção de metais de efluentes reais, o que se concluiu foi que para o efluente da zincagem nenhuma das plantas mostrou ser suficientemente eficiente na remoção de metais (< 25%). Por outro lado, para a AMD os resultados foram positivos do ponto de vista do tratamento deste tipo de água; principalmente para o extrato de *C. ladanifer*, com o qual se obtiveram boas remoções (Al: ~63%, Zn: ~51%, Fe: ~52%, Cu: ~43% e Mn: ~36%). Com o extrato de *E. andevalensis* na AMD, apesar das percentagens de remoção serem mais baixas (Al: ~10%, Zn: ~16%, Fe: ~21%, Cu: ~6% e Mn: ~1%), estas ainda correspondem a elevadas quantidades de metais removidos uma vez que a AMD testada é extremamente concentrada.

Por fim, os testes de utilização de compostos de plantas diluídos em solventes orgânicos para recuperação de metais do vertido de zincagem pela técnica de extração por solvente não foram muito promissores. Os extratos de *C. ladanifer* preparados com Shell GTL e Octanol ou apenas Shell GTL foram seletivos para ferro, mas com remoções

muito baixas (<10%). Por outro lado, nos testes com acetato de etilo enriquecido com compostos fenólicos de folhas de plantas conclui-se: (i) que a utilização da água acidificada (1.2M HCl) aumenta a concentração de compostos fenólicos extraídos, (ii) que a percentagem de acetona influencia o rendimento de extração de compostos fenólicos, obtendo-se uma concentração mais alta com 80% (v/v) de acetona em água acidificada, e (iii) que há uma relação direta entre a concentração de fenóis no acetato de etilo e a eficiência da extração de metais. No entanto a extração não é seletiva nem para ferro nem para zinco. Para além disso, nos testes adicionais com compostos fenólicos transferidos para outros solventes orgânicos menos solúveis em água que o acetato de etilo (butirato de etilo, acetato de butilo, decanol e octanol) continua a não haver seletividade e as eficiências de remoção de zinco e ferro são inferiores.

5. Perspetivas Futuras

Testar os extratos hidroalcoólicos das plantas *C. ladanifer* e *E. andevalensis* para recuperar metais do grupo da platina, prata e ouro de lixiviados de catalisadores automóveis, placas eletrónicas ou outros resíduos em escala laboratorial, e avaliar o potencial, do ponto de vista processual e económico, de aplicação à escala piloto com o objetivo final de exploração industrial.

6. Referências

- Abreu, M.M., Santos, E., Fernandes, E., Batista, M. J., Ferreira, M. (2011). Accumulation and translocation of trace elements in *Cistus ladanifer* L. from IPB portuguese mining areas. *Revista de Ciências Agrárias*, XXXIV, 44–56.
- Abreu, M. M., Santos, E. S., Magalhães, M. C. F., Fernandes, E. (2012). Trace elements tolerance, accumulation and translocation in *Cistus populifolius*, *Cistus salviifolius* and their hybrid growing in polymetallic contaminated mine areas. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.05.001>
- Abreu, M. M., Tavares, M. T. Batista, M. J. (2008). Potential use of *Erica andevalensis* and *Erica australis* in phytoremediation of sulphide mine environments: São Domingos, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration*, 96(2–3), 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2007.04.007>
- Abreu, M M, Magalhaes, M. C. F. (2009). Phytostabilization of soils in mining areas: case studies from Portugal. In: Aachen, L., Eichmann, P. (Eds.), *Soil Remediation*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 297–344
- Abreu, M. M., Godinho, B., Magalhães, M. C. F. (2014). Risk assessment of *Arbutus unedo* L. fruits from plants growing on contaminated soils in the Panasqueira mine area, Portugal. *Journal of Soils and Sediments*, 14(4), 744–757. <https://doi.org/10.1007/s11368-013-0835-7>
- Adriano, D. C., Wenzel, W. W., Vangronsveld, J., Bolan, N. S. (2004). Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma*, 122(2-4 SPEC. IIS.), 121–142. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.003>
- Ahmad, N., Sharma, S., Alam, M. K., Singh, V. N., Shamsi, S. F., Mehta, B. R., Fatma, A. (2010). Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.029>
- Allothman, M., Bhat, R., Karim, A. A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia , extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.005>
- Alvarenga.P.M., AraújoJ.M.F., Silva.J.A.L., Elemental uptake and root-leaves transfer in *Cistus Ladanifer* L. growing in a contaminated Pyrite mining area (Aljustrel-Portugal). *Water, Air, and Soil Pollution*, 2004. **152**(1-4): p. 81-96.
- Anawar.H.M., Freitas.M.C., Canha.N., Santa Regina.I., Arsenic, antimony, and other trace element contamination in a mine tailings affected area and uptake by tolerant plant species. *Environmental Geochemistry and Health*, 2011. **33**(4): p. 353-362.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *The Analyst*, 125(5), 989–1009. <https://doi.org/10.1039/b000080i>

- Azmi, A. A., Jai, J., Zamanhuri, N. A., Yahya, A. (2018). Precious Metals Recovery from Electroplating Wastewater: A Review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 358(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/358/1/012024>
- Bojic, A. L., Bojic, D., Andjelkovic, T. (2009). Removal of Cu²⁺ and Zn²⁺ from model wastewaters by spontaneous reduction-coagulation process in flow conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2–3), 813–819. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.096>
- Brooks, R. R. (1977). Copper and cobalt uptake by *Haumaniastrum* species. *Plant and Soil*, 48(2), 541–544. <https://doi.org/10.1007/BF02187261>
- Cabezudo, B., Rivera, J. (1980). Notas taxonómicas y corológicas sobre la Flora de Andalucía occidental. 2: *Erica andevalensis* Cabezudo y Rivera sp. nov. *Lagasalia*, 9, 223–226.
- Chibuike, G. U., Obiora, S. C. C. (2014). Heavy Metal Polluted Soils : Effect on Plants and Bioremediation Methods. *Applied and Environmental Soil Science*, 2014, 1–3. <https://doi.org/10.1155/2014/752708>
- Chirinos, R., Betalleluz-Pallardel, I., Huamán, A., Arbizu, C., Pedreschi, R., & Campos, D. (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 113(4), 1243–1251. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.015>
- Chung, I.-M., Park, M. R., Chun, J. C., Yun, S. J. (2003). Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, 164(1), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00341-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00341-2)
- Cruces, E., Rojas-Lillo, Y., Ramirez-Kushel, E., Atala, E., López-Alarcón, C., Lissi, E., Gómez, I. (2016). Comparison of different techniques for the preservation and extraction of phlorotannins in the kelp *Lessonia spicata* (*Phaeophyceae*): assays of DPPH, ORAC-PGR, and ORAC-FL as testing methods. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 573–580. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0602-9>
- Diaz Napal, G. N., Defagó, M. T., Valladares, G. R., Palacios, S. M. (2010). Response of *Epilachna paenulata* to Two Flavonoids, Pinocembrin and Quercetin, in a Comparative Study. *Journal of Chemical Ecology*, 36(8), 898–904. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9823-1>
- Diem, Q., Elisa, A., Tran-nguyen, P. L. (2013). ScienceDirect Effect of extraction solvent on total phenol content , total flavonoid content , and antioxidant activity of *Linnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- Díez Lázaro, J., Kidd, P. S., Monterroso Martínez, C. (2006). A phytochemical study of the Trás-os-Montes region (NE Portugal): Possible species for plant-based soil remediation technologies. *Science of the Total Environment*, 354(2–3), 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.001>
- Dixit, A; Dixit, S, CS, G. (2015). Eco-friendly Alternatives for the Removal of Heavy

- Metal Using Dry Biomass of Weeds and Study the Mechanism Involved. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 06(03). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000290>
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B.P., Rai, J.P., Sharma, P. K., Lade, H., Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability (Switzerland)*, 7(2), 2189–2212. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
- Duffus, J. H. (2002). “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 793–807. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>
- Durães, N., Bobos, I., Ferreira da Silva, E., Dekayir, A. (2015). Copper, zinc and lead biogeochemistry in aquatic and land plants from the Iberian Pyrite Belt (Portugal) and north of Morocco mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(3), 2087–2105. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3394-6>
- Ferreira, O., Pinho, S. P. (2012). Solubility of Flavonoids in Pure Solvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(18), 6586–6590. <https://doi.org/10.1021/ie300211e>
- Fornalczyk, A., Saternus, M. (2009). Removal of platinum group metals from the used auto catalytic converter. *Metalurgija*, 2, 133–136.
- Freitas, H., Prasad, M. N. V., Pratas, J. (2004). Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: Environmental implications. *Environment International*, 30(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00149-1)
- Fu, F., Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Garbisu, C., Alkorta, I. (2003). Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *European Journal of Mineral Processing & Environmental Protection*, 3(1), 58–66.
- Hosseini, S. S., Bringas, E., Tan, N. R., Ortiz, I., Ghahramani, M., Alaei Shahmirzadi, M. A. (2016). Recent progress in development of high performance polymeric membranes and materials for metal plating wastewater treatment: A review. *Journal of Water Process Engineering*, 9, 78–110. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.11.005>
- INETI. (2000). Guia Técnico Tratamento de Superfície. *PNAPRI- Guia Técnico Sectorial Dos Tratamentos de Superfície*.
- Jaffre, T., Brooks, R. R., Trow, J. M. (1979). Hyperaccumulation of nickel by Geissois species. *Plant and Soil*, 51(1), 157–161. <https://doi.org/10.1007/BF02205937>
- Jardim Botânico UTAD. (n.d.). *Cistus ladanifer* subsp. *ladanifer*. Adedido a 20 Janeiro 2019, from https://jb.utad.pt/especie/Cistus_ladanifer_subesp_ladanifer
- Karamac, M. (2007). Fe(II), Cu(II) and Zn(II) chelating activity of buckwheat and

- buckwheat groats tannin fractions. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57(3), 357–362.
- Karamać, M. (2009). Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(12), 5485–5497. <https://doi.org/10.3390/ijms10125485>
- Kennedy, D. O., Wightman, E. L. (2011). Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain function. *Advances in Nutrition*, 2(1), 32–50. <https://doi.org/10.3945/an.110.000117>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds, 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Kobyła, M., Demirbas, E., Ozyonar, F., Sirtbas, G., Gengec, E. (2016). Treatments of alkaline non-cyanide, alkaline cyanide and acidic zinc. *Process Safety and Environmental Protection*, 5, 373–385. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.11.020>
- Krämer, U. (2010). Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 517–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112156>
- Ma, L. Q., Komar, K. M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E. D. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409(6820), 579–579. <https://doi.org/10.1038/35054664>
- Macaskie L.E., Mikheenko I.P., Yong P., Deplanche K., Murray A.J., Paterson-Beedle M., Coker V.S., Pearce C.I., Cutting R., Patrick R.A.D, Vaughan D., G. van der Laan, J.R. Lloyd, Today's wastes, tomorrow's materials for environmental protection, *Hydrometallurgy* 104(3-4) (2010) 483-487
- Malaisse, F., Gregoire, J., Brooks, R. R., Morrison, R. S., Reeves, R. D. (1978). *Aeolanthus biformifolius* De Wild.: A Hyperaccumulator of Copper from Zaire. *Science*, 199(4331), 887–888. <https://doi.org/10.1126/science.199.4331.887>
- Márquez-García, B., Fernández, M. Á., Córdoba, F. (2009). Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresource Technology*, 100(1), 446–451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.070>
- Márquez-García, B., Pérez-López, R., Ruíz-Chancho, M. J., López-Sánchez, J. F., Rubio, R., Abreu, M. M., Nieto, J. M., Córdoba, F. (2012). Arsenic speciation in soils and *Erica andevalensis* Cabezudo & Rivera and *Erica australis* L. from São Domingos Mine area, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration*, 119–120, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.06.012>
- Martins, M., Santos, E. S., Faleiro, L. M., Chaves, S., Tenreiro, R., Barros, R. J., Barreiros, A., Costa, M. C. (2011). International Biodeterioration & Biodegradation Performance and bacterial community shifts during bioremediation of acid mine drainage from two Portuguese mines. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(7), 972–981. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.07.006>
- Mesjasz-Przybyłowicz, J., Nakonieczny, M., Migula, P., Augustyniak, M., Tarnawska, M., Reimold, W., Koeberl, C., Przybyłowicz, W. J., Elz, A., Bieta Głowacka, . (2004). Uptake of cadmium, lead, nickel and zinc from soil and water solutions by

the nickel hyperaccumulator Berkheya coddii. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA Series Botanica* (Vol. 46).

- Mohamad, N. A. N., Arham, N. A., Jai, J., Hadi, A. (2013). Plant Extract as Reducing Agent in Synthesis of Metallic Nanoparticles: A Review. *Advanced Materials Research*, 832, 350–355. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.832.350>
- Monaci, F., Leidi, E. O., Mingorance, M. D., Valdés, B., Oliva, S. R., Bargagli, R. (2011). Selective uptake of major and trace elements in *Erica andevalensis*, an endemic species to extreme habitats in the Iberian Pyrite Belt. *Journal of Environmental Sciences*, 23(3), 444–452. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60429-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60429-9)
- Naik, Y. Arthoba, Venkatesha, T. V. (2003). A new brightener for zinc plating from non-cyanide alkaline bath. *Indian Journal of Engineering and Materials Sciences*, 10(4), 318–323.
- Naczk, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, 1054, 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
- Naczk, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, 41, 1523–1542. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Naik, Yanjerappa Arthoba, Venkatesha, T. V., Nayak, P. V. (2002). Electrodeposition of zinc from chloride solution. *Turkish Journal of Chemistry*, 26(5), 725–733. <https://doi.org/10.1007/BF01084132>
- O. Elekwachi, C., Andresen, J., Hodgman, T. C. (2014). Global Use of Bioremediation Technologies for Decontamination of Ecosystems. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 05(04), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000225>
- Ogwuegbu, M. O. C., Muhanga, W. (2005). *Investigation of lead concentration in the blood of people in the copper belt province of Zambia*. *J. Environ.* (Vol. 1).
- Parija, S. C., Ravinder, P. T. (1997). Lacto-phenol cotton blue stain for the wet mount preparation of hydatid fluid. *Tropical Doctor*, 27(2), 108. <https://doi.org/10.1177/004947559702700223>
- Patil, I. D., Patil, Y. S., Pangarkar, B. L. (2013). Removal of lindane from wastewater using liquid-liquid extraction process. *Polish Journal of Chemical Technology*, 15(3), 81–84. <https://doi.org/10.2478/pjct-2013-0050>
- Prasad, R. (2014). Synthesis of Silver Nanoparticles in Photosynthetic Plants. <https://doi.org/10.1155/2014/963961>
- Puigdomenech, I. (2015). Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software (database update: 01-01-2015; Hydra: 32 bit version 18 Aug. 2009; Medusa: 32 bit version 16 Dec. 2010). KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden. <https://www.kth.se/che/medusa>
- Quental, L., Bourguignon, A., Sousa, A. J., Batista, M. J., Brito, M. G., Tavares, T.,

- Abreu, M. M., Vairinho, M., Cottard, F. (2002). MINEO Southern Europe environment test site. Contamination impact mapping and modelling-Final Report. *Assessing and Monitoring the Environmental Impact of Mining Activities in Europe Using Advanced Earth Observation Techniques (MINEO) 5yth FP-IST-1999-10337*.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, *180*(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Raskin, I., Kumar, P. N., Dushenkov, S., Salt, D. E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, *5*(3), 285–290. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90030-2)
- Reeves, R.D., Brooks, R. R. (1983). Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from mining areas of Central Europe. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, *31*(4), 277–285. [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(83\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0143-1471(83)90064-8)
- Reeves, R. D. (2003). Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil*. 249, pp 57–65. <https://doi.org/10.2307/24129328>
- Reeves, R. D., Baker, A. J. M., Jaffré, T., Erskine, P. D., Echevarria, G., van der Ent, A. (2018). A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloid trace elements. *New Phytologist*, *218*(2), 407–411. <https://doi.org/10.1111/nph.14907>
- Reeves, R. D, Ent, A. Van Der, Baker, A. J. M. (2018). Agromining: Farming for Metals. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1803-8>
- Reeves, R. D, Schwartz, C., Morel, J. L., Edmondson, J. (2001). Distribution and Metal-Accumulating Behavior of *Thlaspi caerulescens* and Associated Metallophytes in France. *International Journal of Phytoremediation*, *3*(2), 145–172. <https://doi.org/10.1080/15226510108500054>
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* *7*;51(10):2866-87. <https://doi.org/10.1021/JF026182T>
- Rodríguez, N., Amils, R., Jiménez-Ballesta, R., Rufo, L., & De La Fuente, V. (2007). Heavy metal content in *Erica andevalensis*: An endemic plant from the extreme acidic environment of tinto river and its soils. *Arid Land Research and Management*, *21*(1), 51–65. <https://doi.org/10.1080/15324980601074578>
- Rossini-Oliva, S., Abreu, M. M., Leidi, E. O. (2018). A review of hazardous elements tolerance in a metallophyte model species: *Erica andevalensis*. *Geoderma*, *319*(January), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.12.035>
- RoyChowdhury, A., Sarkar, D., Datta, R. (2015). Remediation of Acid Mine Drainage-Impacted Water. *Current Pollution Reports*, *1*(3), 131–141. <https://doi.org/10.1007/s40726-015-0011-3>
- Sáez, R., Pascual, E., Toscano, M., Almodóvar, G. R. (1999). The Iberian type of volcano-sedimentary massive sulphide deposits. *Mineralium Deposita*, *34*(5–6), 549–570. <https://doi.org/10.1007/s001260050220>

- Santos, E. S., Abreu, M. M., Batista, M. J., Magalhães, M. C. F. (2014). Inter-population variation on the accumulation and translocation of potentially harmful chemical elements in *Cistus ladanifer* L. from Brancanes, Caveira, Chança, Lousal, Neves Corvo and São Domingos mines in the Portuguese Iberian Pyrite Belt. *Journal of Soils and Sediments*, 14(4), 758–772. <https://doi.org/10.1007/s11368-014-0852-1>
- Santos, E. S., Abreu, M. M., Magalhães, M. C. F. (2016). *Cistus ladanifer* phytostabilizing soils contaminated with non-essential chemical elements. *Ecological Engineering*, 94, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.05.072>
- Santos, E. S., Abreu, M. M., Nabais, C., Magalhães, M. C. F. (2012). Trace element distribution in soils developed on gossan mine wastes and *Cistus ladanifer* L. tolerance and bioaccumulation. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.05.006>
- Santos, E. S., Abreu, M. M., Nabais, C., Saraiva, J. A. (2009). Trace elements and activity of antioxidative enzymes in *Cistus ladanifer* L. growing on an abandoned mine area. *Ecotoxicology*, 18(7), 860–868. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0329-y>
- Santos, E. S., Nabais, C., Abreu, M. M. (2013). Adaptabilidade ecofisiológica de diferentes populações de *Cistus ladanifer* L. do sul de Portugal
- Sobczyk, M. K., Smith, J. A. C., Pollard, A. J., Filatov, D. A. (2017). Evolution of nickel hyperaccumulation and serpentine adaptation in the *Alyssum serpyllifolium* species complex. *Heredity*, 118(1), 31–41. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.93>
- Soldevilla, M., Marañón, T., Cabrera, F. (1992). Heavy metal content in soil and plants from a pyrite mining area in Southwest Spain. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 23(11–12), 1301–1319. <https://doi.org/10.1080/00103629209368667>
- Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J. N., Xu, Z., Finley, J. W. (2012). Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), 6658–6677. <https://doi.org/10.1021/jf300861c>
- Stein, R. J., Höreth, S., de Melo, J. R. F., Syllwasschy, L., Lee, G., Garbin, M. L., Clemens, S., Krämer, U. (2017). Relationships between soil and leaf mineral composition are element-specific, environment-dependent and geographically structured in the emerging model *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*, 213(3), 1274–1286. <https://doi.org/10.1111/nph.14219>
- Sumner, M. E. (2000). Beneficial use of effluents, wastes, and biosolids. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(11–14), 1701–1715. <https://doi.org/10.1080/00103620009370532>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- van der Ent A, A., Baker, A. J. M., Reeves, R. D., Chaney, R. L., Anderson, C. W. N., Meech, J. A., Erskine, J. D., Simonnot, M. O., Vaughan, J., More, J. L. Echevarria, G., Fogliani, B. Rongliang, Q., Mulligan, D. R. (2015). Agromining: Farming for

Metals in the Future? *Environmental Science & Technology*, 49(8), 4773–4780.
<https://doi.org/10.1021/es506031u>

Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181(4), 759–776.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x>

Woller, N., Subklew, G., Schwuger, M. J. (1996). Reactive liquid-liquid extraction of heavy metals from leachate with oil-soluble complexing surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 117(1–2), 189–200.
[https://doi.org/10.1016/0927-7757\(96\)03698-9](https://doi.org/10.1016/0927-7757(96)03698-9)

Won S.W., Kotte P., Wei W., Lim A., Yun Y.S., Biosorbents for recovery of precious metals, *Bioresource Technology* 160 (2014) 203–212.

Wuana, R. A., Okieimen, F. E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *Ecology*, 1–20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>

Yavuz, Ö., Altunkaynak, Y., Güzel, F. (2003). Removal of copper, nickel, cobalt and manganese from aqueous solution by kaolinite. *Water Research*, 37(4), 948–952.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00409-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00409-8)

Anexos

Anexo I- Médias das concentrações dos metais e os resultados dos testes estatísticos para comparação das mesmas

Para extrato de *Cistus ladanifer* e soluções unimetálicas em HCl:

Teste	Zn	Fe	Mn	Cu	Pt	Pd	Al	Au
Teste 1h	33±2 ^a	47±3 ^a	50±3 ^a	43±1 ^a	44±2 ^a	41,91±0,05 ^a	52±1 ^a	21±6 ^a
Teste 48h	31,5±0,4 ^a	46,4±0,3 ^a	47±3 ^a	37±2 ^b	48±2 ^a	33,5±0,2 ^b	49±2 ^a	18±9 ^a
Controlo 1h	31±4 ^a	52±1 ^b	49,7±0,5 ^a	42±3 ^a	57±1 ^b	56±2 ^c	50±11 ^a	53,2±8 ^b
Controlo 48h	31±2 ^a	53,9±0,8 ^b	49,6±0,8 ^a	42,2±0,7 ^a	57,3±6 ^b	57±2 ^c	49±9 ^a	53±2 ^b

As médias de concentração com as mesmas letras não diferem significativamente no nível 0,05 (testes ANOVA e Tukey Kramer).

Para extrato de *Cistus ladanifer* e soluções unimetálicas em H₂SO₄:

Teste	Zn	Fe	Mn	Cu	Pt	Pd	Al	Ag	Au
Teste 1h	46±1 ^a	41±1 ^a	64±3 ^a	55±2 ^a	46±1 ^a	46,7±0,4 ^a	46±6 ^a	6,1±0,2 ^a	35±2 ^a
Teste 48h	46±1 ^a	40,2±0,4 ^a	64±1 ^a	51±1 ^a	40,3±0,2 ^a	42±1 ^a	45±1 ^a	0,3±0,2 ^a	0±5 ^b
Controlo 1h	40±3 ^a	54,5±0,6 ^b	60,9±0,3 ^a	40±2 ^b	57±2 ^b	42±2 ^a	49,3±0,4 ^a	66±4 ^b	54±3 ^c
Controlo 48h	37±8 ^a	54±1 ^b	61±4 ^a	48±5 ^a	57±4 ^b	26±4 ^b	49.1±0,4 ^a	67±3 ^b	53,8±0,3 ^c

As médias de concentração com as mesmas letras não diferem significativamente no nível 0,05 (testes ANOVA e Tukey Kramer).

Para extrato de *Erica andevalensis* e soluções unimetálicas em HCl:

Teste	Zn	Fe	Mn	Cu	Pt	Pd	Al	Au
Teste 1h	30±2 ^a	40±6 ^a	50,45±0,1 ^a	42±1 ^a	49±1 ^a	12±2 ^a	52±1 ^a	29±2 ^a
Teste 48h	32±2 ^a	40±9 ^a	50±2 ^a	35±3 ^a	57±1 ^b	23±4 ^b	51,3±0,3 ^a	8±2 ^b
Controlo 1h	31±4 ^a	52±1 ^b	49,7±0,5 ^a	42±3 ^a	57±1 ^b	56±2 ^c	50±11 ^a	53,2±8 ^c
Controlo 48h	31±2 ^a	53,9±0,8 ^b	49,6±0,8 ^a	42,2±0,7 ^a	57,3±6 ^b	57±2 ^c	49±9 ^a	53±2 ^c

As médias de concentração com as mesmas letras não diferem significativamente nível 0,05 (testes ANOVA e Tukey Kramer).

Para extrato de *Erica andevalensis* e soluções unimetálicas em H₂SO₄:

Teste	Zn	Fe	Mn	Cu	Pt	Pd	Al	Ag	Au
Teste 1h	50,6±0,2 ^a	48±5 ^a	61±2 ^a	55±1 ^a	35±2 ^a	49±1 ^a	47±2 ^a	9±3 ^a	4±4 ^a
Teste 48h	48±2 ^a	47±1 ^a	67±1 ^b	55±1 ^a	36±1 ^a	48±1 ^a	46±3 ^a	5±2 ^a	0,4±1 ^a
Controlo 1h	40±3 ^a	54,5±0,6 ^a	60,9±0,3 ^a	40±2 ^b	57±2 ^b	42±2 ^b	49,3±0,4 ^a	66±4 ^b	54±3 ^b
Controlo 48h	37±8 ^a	54±1 ^a	61±4 ^a	48±5 ^a	57±4 ^b	26±4 ^c	49,1±0,4 ^a	67±3 ^b	53,8±0,3 ^b

As médias de concentração com as mesmas letras não diferem significativamente no nível 0,05 (testes ANOVA e Tukey Kramer).

Anexo II- Valores de pH a partir dos quais é previsível formação de complexos sólidos com os metais em diferentes matrizes obtidos em simulações com o programa informático Medusa-Hydra (Puigdomenech 2015)¹

- Para as soluções unimetaólicas testadas:

Metal ^a	Matriz ^a				
	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄ e HNO ₃	H ₂ SO ₄ e HCl ^b	HCl e HNO ₃	HCl ^b
Zn ²⁺	7,61	7,44	7,56	7,28	7,37
Fe ³⁺	1,65	1,67	0,55	0,48	0,48
Mn ²⁺	6,48	10,34	10,34	10,06	10,24
Cu ²⁺	5,17	5,39	5,31	5,31	5,17
Al ³⁺	3,38	3,4	3,42	3,85	3,85
Pt ²⁺	0,00	0,00	3,83	3,83	3,83
Pd ²⁺	0,00	0,00	3,11	3,11	3,11
Au ³⁺	0,00	0,00	4,30	4,30	4,30
Ag ⁺	9,59	9,59	0,00	0,00	0,00

- a) As simulações fizeram-se com (i) 1 mM de metal por ser um valor próximo das concentrações testadas nos testes com extratos hidroalcoólicos de plantas e soluções unimetaólicas; (ii) 10 mM de H₂SO₄ e 10 mM de HCl porque nos testes os stocks de metais foram diluídos em soluções aquosas nestas concentrações destes ácidos e (iii) 50 mM de HNO₃ porque os stocks de metais utilizados para preparar as soluções unimetaólicas estavam em 500 mM deste ácido e foram diluídos 1:10 para os testes, exceto os de Au e Pt.
- b) As simulações com Au e Pt fizeram-se nas condições descritas em a), exceto para a concentração de HCl que nestes casos foi de 200 mM e 170 mM porque os stocks destes metais estavam em 2 e 1,7 M de HCl, respetivamente.

¹ Puigdomenech, I. (2015). Hydra/Medusa Chemical Equilibrium Database and Plotting Software (database update: 01-01-2015; Hydra: 32 bit version 18 Aug. 2009; Medusa: 32 bit version 16 Dec. 2010). KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

- **Para os principais metais na água de mina testada:**

Metal	H₂SO₄ (1,3 M) HCl (0,6 M)
Fe²⁺ (1 M)	7,42
Al³⁺ (0,2M)	2,38
Cu²⁺ (0.07M)	4,77
Mn²⁺ (0.002M)	10,32